

# **Entwicklung immunchemischer Methoden zur Spurenanalytik der Sprengstoffe Nitropenta und Trinitrotoluol**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

Spezialisierung: Angewandte Analytik und Umweltchemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Almut Hesse, geb. Joachim

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. PD Dr. Michael G. Weller
2. Prof. Dr. Michael W. Linscheid
3. PD Dr. Rudolf J. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017



Meinem lieben Karsten  
und meinen wunderbaren Kindern  
Holger, Matthias und Stefanie

*Für den gläubigen Menschen steht Gott am Anfang,  
für den Wissenschaftler am Ende aller seiner Überlegungen.*

*Max Planck*

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis Dezember 2015 an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) im Fachbereich 1.5 Proteinanalytik unter der Leitung von PD Dr. Michael G. Weller angefertigt und am 30.11.2016 an der Humboldt-Universität zu Berlin eingereicht.



## Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Dr. Michael G. Weller für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Bereitschaft mir die Gelegenheit zu geben, eine Dissertation in seinem Fachbereich "Proteinanalytik" anfertigen zu dürfen. Seine fachliche Unterstützung, seine wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie sein immerwährender Zuspruch bei Misserfolgen haben mich stets motiviert.

Der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) danke ich für die Bereitstellung der technischen und finanziellen Mittel. Bei Steffen Ramin möchte ich mich für die Nutzung seiner im Rahmen seiner Diplomarbeit an der BAM hergestellten TNT-Antiseren bedanken, für die Einführung in die ELISA und SAW-Technik sowie für die Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN). Mustafa Biyikal danke ich für die Durchführung der weiteren Hapten-Syntheseschritte zum Pentaerythritoltrinitrat-methyl-5-carboxypentylcarbonat.

Meiner Praktikantin Eveline Wehnert, die im Rahmen ihres Forschungsprojekts Experimente zur TNT-Serumsreinigung durchführte, danke ich für ihr Engagement und den wissenschaftlichen Beitrag zu dieser Arbeit. Meiner Praktikantin Sarah Volkmann danke ich für ihre fleißige Arbeit während ihres Forschungspraktikums. Weiterhin möchte ich mich bei Lidia Oberleitner und Prof. Dr. Sergei A. Eremin für die Einführung in die Fluoreszenz-Polarisation-Immunoassay-Technik bedanken.

Vielen Dank an meine Kollegen aus dem Fachbereich 1.5 "Proteinanalytik": Shireen Ewald, Dr. Heike Pecher, Steffen Ramin, Dr. Bogdan Bernevik, Oleg Klykov, Dr. Franziska Diezmann, Timm Schwaar und Ioana Sighiartau für die kollegiale Zusammenarbeit. Shireen Ewald danke ich besonders für die Messungen an der Orbitrap, insbesondere die hochauflösenden Massenspektren im Rahmen der PETN-Haptensynthese sowie die unzähligen TNT-Messungen. Bei Bogdan Bernevic bedanke ich mich für die MALDI-Messungen der Hapten-Protein-Konjugate.

Der Firma Tosoh Bioscience und Dr. Gerhard Bienhaus von der Firma VitraBio danke ich für die Zusendung kostenloser Proben der Trägermaterialien Toyopearl® und Trisopor™. Annett Zimathies sei für die Stickstoffadsorptions- und Quecksilber-Intrusionsporosimetriemessungen meiner porösen Gläser gedankt und für die Zeit, die sie sich für die Diskussion und Auswertung der Ergebnisse für mich genommen hat. Frau Ines Feldmann danke ich für die Aufnahmen mit dem Licht- und dem Rasterelektronenmikroskop. Für die Konstruktionszeichnung der Säulenheizung danke ich Monika Klinger, für die Umsetzung Manfred Hirsch und Christoph Naese von der BAM-Werkstatt in Adlershof, die auch weitere Sonderwünsche von mir stets mit großem handwerklichem Geschick umsetzten. Dankend erwähnt sei auch der Fachbereich 1.8 "Immunanalytik", bzw. "Umweltanalytik" unter der Leitung von Dr. Rudolf J. Schneider, in dem ich meine ELISA-Experimente und meine HPLC-Messungen durchführen durfte. Herrn Dr. Andreas Lehmann danke ich für die Einführung an der HPLC und besonders für seine schnelle und kompetente Hilfe bei technischen Problemen.

Ein Dankeschön geht ebenfalls an Anka Kohl und meinen Sohn Holger für die immer schnelle IT-Betreuung und technische Hilfe. Weiterhin danke ich der Sekretärin Christin Heinrich, die stets gut gelaunt und hilfsbereit alle nicht wissenschaftlichen Probleme und Fragen klären konnte. Meiner Schwägerin Renate Kraus-Joachim danke ich für die schnelle und hilfreiche Korrektur meiner englischen Vorträge. Großer Dank gilt meinem lieben Mann Karsten und Dr. Joachim Kind für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit und ihre hilfreichen Kommentare.



## Abstract

Pentaerythritol tetranitrate (PETN), an explosive frequently used by terrorists in the recent past, is extremely difficult to detect. An improved antibody against PETN was developed by application of the concept of bioisosteric replacement by exchanging the nitroester for a carbonate diester. Biososteric molecules have a similar structure to the reference substance and show a comparable biological effect. This approach led to an excellent polyclonal antibody with extreme selectivity and immunoassays of very good sensitivity. The detection limit of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was determined to be 0.15 µg/L. The dynamic range of the assay was found to be between 1 and 1000 µg/L. The antibodies are sufficiently pH-stable and resistant to solvent additives. The antiserum could also be used for quick tests, biosensors, microarrays and other analytical methods.

For the environmental analysis of trinitrotoluene (TNT), a high performance liquid chromatography (HPLC) compatible affinity column was prepared. Pressure resistant porous glass has emerged as an excellent support. In order to isolate selective polyclonal anti-TNT antibodies of two different TNT sera for the preparation of the affinity column a separation was carried out on a dinitrophenyl affinity column. To optimize the immobilization method, orange-coloured dabsyl proteins were synthesized and bound to the surface. The colour intensity was found to be an indicator for the immobilization rate. In consequence of the high affinity constants of the polyclonal antibodies of the two rabbit sera to TNT ( $5.1$  or  $2.3 \cdot 10^9$  L/mol, respectively), it is difficult to elute TNT by a typical acidic elution step from a TNT affinity column. Therefore, a novel separation approach, the irreversible denaturing, thermal online-elution was developed. This opens a wide field of applications in so far as affinities, which cannot be used for affinity chromatography due to high binding constants between ligand and receptor, are more manageable for analysis. The maximum capacity of an affinity column (64.8 µL) prepared in this study was 650 ng TNT or 10 µg/mL of column volume.

To quantify the immobilization rate of proteins on affinity columns, a new method has been developed, because the usual spectroscopic protein determination methods were unsuitable for protein determination of support material due to high non-specific interaction. For the quantification of proteins or peptides which are immobilized on solid supports, a HPLC separation method of the aromatic amino acids tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe) was developed without prior derivatization. This method is simpler than the usual amino acid analysis. The hydrolysis of the proteins and peptides was performed by an accelerated microwave technique, which needs only 30 minutes instead of around 22 hours for the standard protocol using a hydrolysis tube. Two internal standard compounds, homotyrosine (HTyr) and 4-fluorophenylalanine (FPhe) were used for calibration. The limit of detection (LOD) was estimated to be 0.05 µM (~ 10 µg/L) for Tyr and Phe at 215 nm. This procedure, that was termed aromatic amino acid analysis (AAAA), has been validated for protein determination of homogeneous samples with bovine serum albumin (BSA) of the National Institute of Standards and Technology (NIST). The LOD for proteins was calculated to be below 16 mg/L (~ 300 ng BSA absolute), which is comparable with spectrophotometric methods. However, it offers better accuracy and a precision of about 5% of relative standard deviation, including the hydrolysis step.





## Kurzzusammenfassung

Pentaerythritoltetranitrat (PETN), ein in jüngster Vergangenheit häufig von Terroristen verwendeter Sprengstoff, ist äußerst schwer zu detektieren. Ein verbesserter Antikörper gegen PETN wurde durch Anwendung des Konzepts des bioisosteren Ersatzes entwickelt, indem ein Nitroester durch einen Carbonsäurediester ersetzt wurde. Biostere Moleküle haben eine ähnliche Struktur wie die Referenzsubstanz und zeigen eine vergleichbare biologische Wirkung. Dieser Ansatz führte zu polyklonalen Antikörpern mit extrem guter Selektivität und Sensitivität. Die Nachweisgrenze des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) beträgt 0,15 µg/L. Der Messbereich des Immunoassays liegt zwischen 1 und 1000 µg/L. Die Antikörper sind sowohl hinreichend pH-stabil als auch robust gegen Lösungsmittelzusätze. Das Antiserum könnte auch für Schnelltests, Biosensoren, Mikroarrays und andere analytische Methoden verwendet werden.

Für die Umweltanalytik von Trinitrotoluol (TNT) wurde eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-kompatible Affinitätssäule hergestellt. Druckbeständiges, poröses Glas hat sich als ein hervorragendes Trägermaterial herauskristallisiert. Um selektive anti-TNT-Antikörper für die Herstellung der Affinitätssäule aus den beiden verwendeten TNT-Seren zu isolieren, wurde eine Trennung an einer Dinitrophenyl-Affinitätssäule durchgeführt. Zur Optimierung der Immobilisierungsmethode wurden orangefarbene Dabsyl-Proteine synthetisiert und auf der Oberfläche gebunden. Die Färbung wurde als Indikator für die Immobilisierungsdichte verwendet. Wegen der hohen Affinitätskonstanten der polyklonalen anti-TNT-Antikörper der beiden Seren (5,1 bzw.  $2,3 \cdot 10^9$  L/mol) lässt sich TNT durch eine typische saure Elution der TNT-Affinitätssäule nur schwer eluieren. Aus diesem Grund wurde eine neuartige Elutionsmethode entwickelt, die irreversible, denaturierende, thermische Online-Elution. Diese eröffnet ein weites Anwendungsfeld, da so Affinitäten, die klassischerweise aufgrund zu hoher Bindungskonstanten zwischen Ligand und Rezeptor nicht für die Affinitätschromatographie genutzt werden können, für die Analytik besser handhabbar werden. Die maximale Kapazität einer im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Affinitätssäule (64,8 µL) betrug 650 ng TNT bzw. 10 µg/mL Säulenvolumen.

Um die Immobilisierungsdichte der produzierten Affinitätssäulen zu bestimmen, wurde ein neues Verfahren entwickelt, da die üblichen spektroskopischen Proteinbestimmungsmethoden aufgrund der hohen unspezifischen Wechselwirkung mit dem Trägermaterial zur Proteinbestimmung nicht geeignet waren. Zur Quantifizierung von Proteinen oder Peptiden, die auf festen Trägern immobilisiert sind, wurde auf Grundlage einer HPLC-Trennung der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe) ohne vorherige Derivatisierung eine gegenüber der klassischen Aminosäureanalytik vereinfachte HPLC/UV-Methode entwickelt. Die Hydrolyse der Proteine und Peptide wurde durch Einsatz von Mikrowellentechnik beschleunigt, sodass nur 30 Minuten statt ca. 22 Stunden für das Standardprotokoll benötigt wurden, bei dem ein Hydrolyseröhrchen verwendet wird. Zur internen Kalibrierung wurden zwei Standardverbindungen, Homotyrosin (HTyr) und 4-Fluorphenylalanin (FPhe) verwendet. Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) bei 215 nm ist sowohl für Tyr als auch für Phe 0,05 µM (~ 10 µg/L). Dieses neue Verfahren, das als Aromatische Aminosäureanalyse (Aromatic Amino Acid Analysis, AAAA) bezeichnet werden kann, wurde zur Proteinbestimmung von homogenen Proben mit Rinderserumalbumin (BSA) des Nationalen Instituts für Standards und Technologie der USA (NIST) validiert, wobei die Nachweisgrenze für Proteine mit 16 mg/L (~ 300 ng BSA) mit gängigen spektroskopischen Verfahren vergleichbar ist. Es liefert incl. der Hydrolysestufe eine verbesserte Genauigkeit mit einer relativen Standardabweichung von ca. 5%.



## Abkürzungsverzeichnis

$A_{280}$	Absorption bei 280 nm (analog für andere Wellenlängen)
AAA, ASA	Aminosäureanalyse (Amino Acid Analysis)
AAAA	Aromatische Aminosäureanalyse (Aromatic Amino Acid Analysis)
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat
$A_{\text{BET}}$	BET-Oberfläche
ACN	Acetonitril
$a_m$	BET Stickstoffmonolayer mit dichtester Packung bei 77 K (0,162 nm <sup>2</sup> )
AUC	Analytische Ultrazentrifugation
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BET	Brunauer-Emmett-Teller (Analyseverfahren zur Oberflächenbestimmung)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration (concentration)
CAS	Chemical Abstracts Service
CC BY-SA	Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 Unported (Lizenzbestimmung)
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CHCA	$\alpha$ -Cyan-4-hydroxyzimtsäure ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
CPG	Controlled Pore Glass
CRM	Certified Reference Material
DAD	Diodenarraydetektor
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNP	Dinitrophenyl
DOC	Desoxycholat
DSC	Di-(N-Succinimidyl)carbonat
DTT	Dithiothreitol, 4-Dimercapto-2,3-butandiol, Clelands Reagenz
E	Extinktion
ECD	Electron capture detector
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA	US-amerikanische Umweltschutzbehörde (Environmental Protection Agency)
EtOH	Ethanol
$F_{\text{ab}}$	Antigen-bindendes Fragment (antigen-binding Fragment)
$F_{\text{c}}$	Kristallisierbares Fragment (crystallizable Fragment)
FFF	Feldflussfraktionierung
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FPhe	4-Fluorphenylalanin
GST	Glutathion-S-Transferase

HPhe	Homophenylalanin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HTyr	Homothyrosin
I	Immobilisierungsdichte
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration (half maximal inhibitory concentration)
ID	Innendurchmesser (inner diameter)
IgG	Immunglobulin G
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
IR	Infrarot
ITMS	Ionenfallenmobilitätsspektroskopie (Ion Trap Mobility Spectrometry)
K1B9	Kaninchenserum 1, Boost 9 (nach der 9. Injektion des TNT-Immunogens)
K2B12	Kaninchenserum 2, Boost 12 (nach der 12. Injektion des TNT-Immunogens)
K <sub>A</sub>	Bindungskonstante oder Affinitätskonstante
K <sub>H</sub>	Henry-Konstante
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (Keyhole Limpet Hemocyanin)
KR	Kreuzreaktivität
LD50	Mittlere letale Dosis bzw. mittlere letale Konzentration
LM	Lösungsmittel
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
M	1. Molmasse oder 2. Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MALS	Multi angle light scattering
MBP	Maltose-bindendes Protein
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
n <sub>a</sub>	Adsorbierte Stickstoffmenge
N <sub>A</sub>	Avogadro-Konstante ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
n <sub>m</sub>	Monolayerkapazität
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
OD	1. Außendurchmesser (Outer Diameter) oder 2. Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p	1. Druck oder 2. Gleichgewichtsdruck der Stickstoffadsorption
p <sub>0</sub>	Sättigungsdampfdruck des Adsorptivs
PA	Propionsäure (propionic acid)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered Saline)
PD10-Säule	Entsalzungssäule (GE Healthcare)
PDC	Pyridiumdichromat

PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglycol
PETN	Pentaerythryltetranitrat, Nitropenta, Pentrit
PETriN	Pentaerythrittrinitrat
Phe	Phenylalanin
POD	(Meerrettich-)Peroxidase
QC	Qualitätskontrolle
R	Universelle bzw. allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
RDX	Hexogen, Cyclotrimethylentrinitramin, Cyclonit, T4 (Research Department Explosive/Royal Demolition Explosive)
REM	Rasterelektronenmikroskop
$r_K$	Kelvinradius
$r_p$	Porenradius
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Empirische Standardabweichung
S, $S_m$	Spezifische Oberfläche
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate), Natriumlaurylsulfat
SFE	Superkritische Flüssigkeitsextraktion (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Surface Plasmon Resonance)
t	1. Zeit oder 2. Schichtdicke des Adsorbats
TATP	Triacetontriperoxid, Acetonperoxid, APEX
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TN6PHA	6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (6-(2,4,6-trinitrophenyl)hexanic acid)
TNP	Trinitrophenyl
TNT	Trinitrotoluol
TOF	Flugzeit (Time-of-Flight)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat (nichtionisches Tensid)
UV	Ultraviolett(strahlung)
V	Volumen
VIS	Sichtbares Licht (Visible light)
$V_M$	Molares Gasvolumen
W	Arbeit
$\alpha$ -IgG	Anti-Immunglobulin G
$\Sigma$	Oberflächenspannung
$\vartheta$	Kontaktwinkel bzw. Benetzungswinkel
X	Stoffmengenanteil des Gases



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	v
Abstract .....	vii
Kurzzusammenfassung .....	ix
Abkürzungsverzeichnis .....	xi
Inhaltsverzeichnis .....	xv
Einleitung und Zielsetzung .....	1
1 Einsatz von Antikörpern zur Detektion organischer Sprengstoffe .....	3
1.1 Organische Sprengstoffe: Trinitrotoluol (TNT) und Nitropenta (PETN) .....	3
1.1.1 TNT .....	3
1.1.2 PETN .....	4
1.2 Detektionssysteme zum Nachweis von Sprengstoffen .....	5
1.2.1 Umweltanalytik .....	5
1.2.2 Sicherheitsbereich .....	6
1.3 Antikörperentwicklung gegen Sprengstoffe .....	8
1.3.1 Antikörper .....	8
1.3.2 Antikörper gegen kleine Moleküle (Haptene) .....	9
1.3.3 PETN-Haptene, Isosterie und Bioisosterie .....	9
1.4 Antikörperbibliothek für TNT und PETN .....	11
1.4.1 Anti-TNT-Antikörper .....	11
1.4.2 Anti-PETN-Antikörper .....	12
2 Affinitätsmethoden .....	13
2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	13
2.1.1 Prinzip .....	13
2.1.2 Präzisionsprofil .....	15
2.1.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten .....	16
2.1.4 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten (KR) .....	16
2.2 Affinitätschromatographie .....	17
2.2.1 Prinzip .....	17
2.2.2 Immobilisierungsreaktionen .....	19
3 Trägermaterialien .....	23
3.1 Allgemeiner Überblick .....	23
3.2 Diverse Trägermaterialien .....	24

3.2.1 Methacrylatderivate.....	24
3.2.2 Sepharose™.....	25
3.2.3 Cellulose.....	25
3.2.4 Poröse Gläser.....	26
3.3 Methoden zur Bestimmung der Porengrößen.....	28
3.3.1 Gasadsorption.....	28
3.3.2 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie .....	30
4 Proteinbestimmung.....	33
4.1 Klassische Proteinbestimmungsmethoden .....	33
4.1.1 Kjeldahl-Methode.....	33
4.1.2 280 nm-Methode .....	34
4.1.3 Biuret-Methode .....	34
4.1.4 Lowry-Methode .....	35
4.1.5 Bradford-Methode.....	35
4.1.6 Bicinchoninsäure-Assay (BCA) .....	36
4.1.7 NanoOrange® -Assay.....	37
4.2 Proteinhydrolyse.....	37
4.3 Aminosäureanalyse .....	40
5 Material und Methoden .....	43
5.1 Synthese des PETN-Haptens und dessen Konjugate.....	43
5.1.1 Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN).....	43
5.1.2 Synthese von Pentaerythritoltrinitratmethyl-6-hydroxyhexylcarbonat .....	43
5.1.3 Synthese von Pentaerythritoltrinitratmethyl-5-carboxypentylcarbonat.....	43
5.1.4 Synthese von NHS-PETriN-Carboxyloxyhexansäureester .....	44
5.1.5 Synthese von PETriN-CHA-BSA (Immunogen) .....	44
5.1.6 Synthese von PETriN-CHA-POD (Tracer) .....	45
5.1.7 MALDI-TOF/MS .....	45
5.2 Immunisierungsprozess und Entwicklung des PETN-Immunoassays .....	46
5.2.1 Immunisierung eines Kaninchens mit PETriN-CHA-BSA-Immunogen .....	46
5.2.2 PETN-ELISA .....	46
5.2.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten aus der Kalibrierkurve .....	47
5.2.4 Bestimmung von Kreuzreaktionen (KR).....	47
5.3 Prüfen der Trägermaterialien für die TNT-Affinitätssäulen.....	47
5.3.1 Säule mit deaktiviertem Fractogel® EMD-Epoxy.....	48
5.3.2 Säule mit deaktiviertem Toyopearl® AF-Tresyl.....	48
5.3.3 Säule mit deaktiviertem Toyopearl® AF-Formyl .....	48



5.3.4 Säule mit deaktivierter NHS-aktivierter Sepharose™	48
5.3.5 Säule mit deaktivierter Formyl-Cellufine™	48
5.3.6 TNT-Kapazitätsmessung der deaktivierten Säulen mittels ELISA	48
5.3.7 TNT-ELISA	49
5.4 Immobilisierungsmethoden von Trisopor™	49
5.4.1 Epoxysilanisierung	49
5.4.2 NHS-Aktivierung von Amino-Trisopor™ und anschließende Hydrolyse	50
5.4.3 pH-Optimierung der Immobilisierung mittels Bis-NHS-Ester-Methode	50
5.4.4 Aktivierung mittels Glutaraldehyd-Methode	51
5.4.5 NHS-Aktivierung nach Reaktion mit Glutarsäureanhydrid	51
5.5 Dabsyl-Methoden zur Bestimmung von Immobilisierungsdichten	51
5.5.1 Herstellung von Dabsyl-BSA	51
5.5.2 Herstellung von überwiegend nativen Dabsyl-markierten BSA	51
5.5.3 Herstellung von Dabsyl-IgG	52
5.5.4 Unterschiedliche Immobilisierungsmethoden für Amino-Trisopor™	52
5.5.5 Immobilisierungen von Dabsylproteinen	52
5.5.6 Partielle Hydrolyse mittels Mikrowelle	52
5.6 Immobilisierungsmethoden für verschiedene Trägermaterialien	52
5.6.1 Immobilisierung auf Toyopearl® AF-Formyl	53
5.6.2 Immobilisierung auf Tresyl-Toyopearl® 650M	53
5.6.3 Immobilisierung auf Cellufine™-Formyl	53
5.6.4 Immobilisierung auf NHS-Sepharose™	53
5.6.5 Immobilisierung auf NHS-aktivierte Agarose	54
5.6.6 Immobilisierung auf UltraLink™ Biosupport	54
5.6.7 Immobilisierung auf Fractogel® EMD-Epoxy	54
5.6.8 Immobilisierung auf Amino-Trisopor™ via Glutaraldehyd-Methode	54
5.6.9 Immobilisierung auf Amino-Trisopor™ via Bis-NHS-Ester-Methode	55
5.7 Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA-Verfahren)	55
5.7.1 Vorexperimente zur Entwicklung des AAAA-Verfahrens	55
5.7.2 Das AAAA-Verfahren	55
5.7.3 Protein Quantifizierung von Peptiden und komplexen Proben	56
5.7.4 Analyse von inhomogenen Proben: Trägermaterial mit immobilisierten BSA	56
5.7.5 Totalhydrolyse in der Mikrowelle	57
5.8 Methoden zur Reinigung der TNT-Seren	57
5.8.1 Protein-A-Reinigung	57
5.8.2 Affinitätssäule mit TN6PHA-Liganden (Trisopor™)	58

5.8.3 Affinitätssäule (Sepharose™) mit 4-Nitrophenyl-Liganden .....	59
5.8.4 Affinitätssäule (Sepharose™) mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden .....	59
5.8.5 Chromatogramme der Affinitätssäulen .....	59
5.8.6 PEG-Affinitätssäule (Trisopor™) mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden .....	60
5.8.7 Bestimmung der Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper .....	61
5.8.8 Bestimmung der pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper .....	61
5.9 Methoden zur Herstellung der TNT-Affinitätssäulen .....	62
5.9.1 TNT-Affinitätssäulen mit Protein-A-gereinigtem anti-TNT-IgG .....	62
5.9.2 HPLC-Chromatogramm sowie entsprechender TNT-ELISA .....	63
5.9.3 Saure versus thermische Elution .....	63
5.9.4 Online-Elution durch Denaturierung mit Lösungsmittel .....	64
5.9.5 Thermische Online-Elution mit Säulenofen .....	64
6 Herstellung und Untersuchung der Antikörper gegen PETN .....	67
6.1 Aufbau und Synthese eines neuen PETN-Haptens .....	67
6.2 Kopplung des Haptens an die Proteine BSA und POD .....	70
6.3 PETN-ELISA .....	74
6.3.1 Bestimmung von Testmittelpunkt und Affinitätskonstante .....	74
6.3.2 Entwicklung der anti-PETN-Antikörper im Laufe der Immunisierung .....	75
6.3.3 Kalibrierungskurven des PETN-ELISAs .....	76
6.4 pH- und Lösungsmittelverträglichkeit der anti-PETN-Antikörper .....	78
6.5 Kreuzreaktivitäten der anti-PETN-Antikörper .....	80
7 Test der Trägermaterialien für die TNT-Affinitätssäule .....	85
7.1 Kapazitätssmessungen der unspezifischen TNT-Bindung .....	85
7.2 Maßnahmen zur Unterdrückung der unspezifischen TNT-Bindung .....	86
7.3 Alternatives synthetisches Trägermaterialien: Toyopearl® .....	87
7.4 Alternative Trägermaterialien zu synthetischen Polymethacrylaten .....	88
7.5 Untersuchungen der Partikel- und Porengröße des porösen Glases .....	89
7.5.1 Lichtmikroskop- und Rasterelektronenmikroskopaufnahmen .....	90
7.5.2 Gasadsorption .....	92
7.5.3 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie .....	93
7.6 Immobilisierungsmethoden für Amino-Trisopor™ .....	95
7.6.1 Immobilisierungsmethoden für Amino-aktivierte Trägermaterialien .....	95
7.6.2 Auswertung der Immobilisierung via Bis-NHS-Ester-Methode .....	96
7.6.3 Abschätzung der benötigten Ligandendichte für eine IgG-Monolayer .....	97
8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen bzw. von gebundenen Proteinmengen .....	99
8.1 BCA-Test .....	99

8.1.1 Zeitabhängigkeit des BCA-Tests.....	99
8.1.2 pH-Optimierung für die Proteinimmobilisierung via Bis-NHS-Ester-Methode .....	100
8.2 Die Dabsylmethode zur Bestimmung der Immobilisierungsdichte.....	101
8.2.1 Charakterisierung der Dabsyl-BSA-Lösung.....	101
8.2.2 Charakterisierung der weitgehend nativen Dabsyl-markierten BSA-Lösung .....	103
8.2.3 Charakterisierung der Dabsyl-IgG-Lösung .....	103
8.2.4 Vergleich verschiedener Immobilisierungsmethoden von Dabsyl-BSA an Trisopor™ ....	104
8.2.5 Partielle Hydrolyse der mit Dabsyl-BSA gekoppelten porösen Gläser in der Mikrowelle	106
8.2.6 Bestimmung der Dabsyl-Immobilisierungsdichten verschiedener Trägermaterialien .....	111
8.3 Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA).....	115
8.3.1 Prinzip des AAAA-Verfahrens.....	115
8.3.2 Auswahl des internen Standards.....	115
8.3.3 Das AAAA-Verfahren.....	119
8.3.4 Validierung des AAAA-Verfahrens zur Proteinbestimmung .....	121
8.3.5 Peptid-Analyse am Beispiel von Hepcidin-25.....	123
8.3.6 Protein-Analyse komplexer Proben.....	124
8.3.7 Mikrowellenhydrolyse.....	125
8.3.8 Analyse von heterogenen Proben: Trägermaterial mit immobilisiertem BSA.....	125
9 Reinigung von TNT-Seren .....	129
9.1 Reinigung mit Protein A.....	129
9.2 Antigenspezifische Reinigung.....	130
9.2.1 Affinitätssäule mit 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (TN6PHA) als Ligand .....	130
9.2.2 Affinitätssäule mit 4-Nitrophenylgruppen als Liganden .....	130
9.2.3 pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper in Abhängigkeit von der Zeit .....	134
9.2.4 Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper .....	135
9.2.5 HiTrap™-Affinitätssäule mit 2,4-Dinitrophenylgruppen als Liganden .....	137
9.2.6 Trisopor™-Affinitätssäule mit 2,4-Dinitrophenylgruppen als Liganden .....	140
10 TNT-Affinitätssäule .....	147
10.1 Abschätzung der Kapazität der TNT-Affinitätssäule .....	147
10.2 TNT-Affinitätssäulen mit Protein A gereinigtem anti-TNT-IgG .....	148
10.2.1 Saure Elution .....	148
10.2.2 Thermische Elution .....	151
10.3 Affinitätssäule mit haptengereinigtem anti-TNT-IgG.....	155
10.3.1 Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel .....	155
10.3.2 Thermische Online-Elution .....	158
10.3.3 Vergleich der TNT-Affinitätssäulen, hergestellt aus den Seren K1B9 bzw. K2B12 .....	166

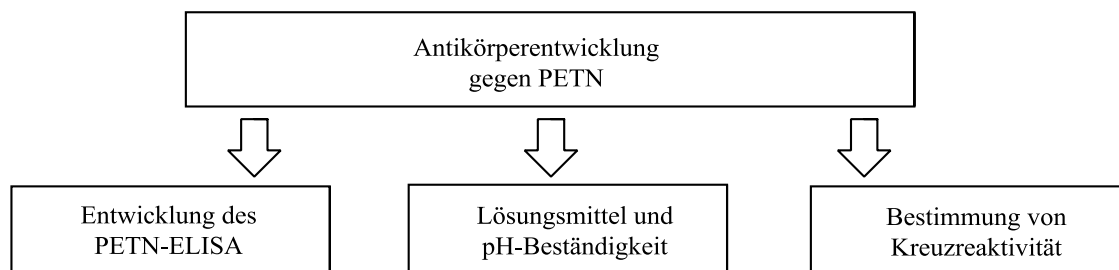
10.4 Bestimmung der Ligandendichte der TNT-Affinitätssäulen .....	170
11 Zusammenfassung und Ausblick.....	175
Anhang .....	179
A1 Chemikalien.....	179
A2 Puffer und Lösungen .....	182
A3 Verbrauchsmaterialien.....	182
A4 Analytische Instrumente .....	185
A5 Geräte .....	188
A6 Konstruktionszeichnung Säulenheizung.....	189
A7 Messungen zur Verifizierung des AAAA-Verfahrens .....	192
A8 Abbildungsverzeichnis .....	193
A9 Tabellenverzeichnis .....	199
Publikationen.....	201
Literaturverzeichnis.....	203





## Einleitung und Zielsetzung

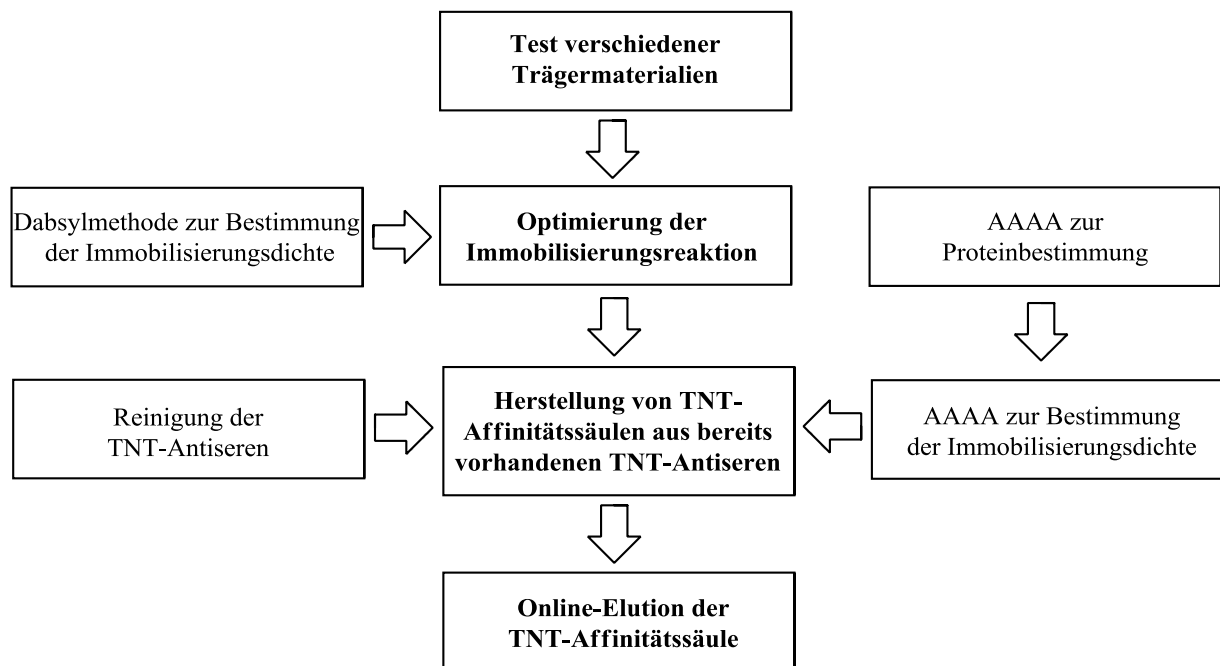
Die schnelle Detektion von Sprengstoffen in sensiblen Bereichen des öffentlichen Lebens gewinnt durch die zunehmende Bedrohung durch Terroranschläge erheblich an Bedeutung. Bei terroristischen Anschlägen der jüngeren Vergangenheit kam dabei immer häufiger Plastiksprengstoff zum Einsatz, sodass hierfür ein schneller, zuverlässiger und selektiver Nachweis benötigt wird. Nitropenta (Pentaerythritetranitrat, PETN) ist häufig ein Bestandteil von Plastiksprengstoff. Selbst Spürhunde können PETN aufgrund des niedrigen Dampfdrucks praktisch nicht detektieren. Als hochselektive PETN-Analytik bieten sich deshalb immunchemische Methoden als Alternative an. Dazu ist jedoch zuerst die Entwicklung empfindlicher, hochselektiver anti-PETN-Antikörper notwendig. In dieser Arbeit wird ein neuartiges Immunogen für die Herstellung solcher Antikörper durch Anwendung des Konzepts des bioisosteren Ersatzes verwendet, d. h. ein Ersatz der Zielsubstanz mit einer struktur-analogen Substanz, die eine vergleichbare biologische Wirkung zeigt. Diese Methode wird häufig in der Pharmazie, bisher jedoch nicht zur Entwicklung von Immunoassays angewandt. Um ein geeignetes Hapten für die Entwicklung von anti-PETN-Antikörpern zu synthetisieren, wurde hier erstmalig ein Carbonatdiester als Struktur analogon für einen Nitroester verwendet. Die erzeugten polyklonalen Antikörper werden auf ihre Eignung zur Detektion von PETN anhand des in dieser Arbeit vorge-stellten PETN-Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) untersucht (Messbereich, Kreuzreak-tivität und Beständigkeit).



*Übersichtsschema zur anti-PETN-Antikörperentwicklung*

Während die Sprengstoffdetektion mit anti-PETN-Antikörpern eine Anwendung im Sicherheitsbereich nahelegt, befindet sich der Fokus bei der Detektion von Trinitrotoluol (TNT) eher im Bereich der Umweltanalytik. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenfalls die Herstellung und Verwendung einer TNT-Affinitätssäule zur Anreicherung untersucht werden, um TNT auch aus extrem schwach kontaminierten Proben mittels selektiver Antikörper anzureichern. Die so isolierte TNT-Menge sollte anschließend auf eine Reversed-Phase-Säule überführt und der TNT-Gehalt mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) quantitativ bestimmt werden. Zur Herstellung der Affinitätssäule musste zunächst ein geeignetes Trägermaterial gefunden und getestet werden. Während der Optimierung des Immobilisierungsprozesses wurden darüber hinaus Defizite der klassischen spektroskopischen Proteinbestimmung zur Bestimmung der Immobilisationsdichten deutlich. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Bestimmung mit gefärbten Proteinen entwickelt (Dabsyl-methode). Darüber hinaus wurde eine neue, allgemein anwendbare Proteinbestimmungsmethode ausgearbeitet, die als Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA) bezeichnet wurde. Mit diesem Verfahren wurden letztendlich die Immobilisierungsdichten der hergestellten TNT-Säulen bestimmt. Um TNT-Affinitätssäulen mit hoher Kapazität zu erhalten, wurden die TNT-Antiseren antigenspezifisch gereinigt. TNT-Antiseren mit polyklonalen Antikörpern wurden bereits in der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) entwickelt und waren daher für diese Arbeit

direkt verfügbar. Die Aufgaben im Zusammenhang mit der Herstellung der TNT-Affinitätssäule sind im folgenden logischen Fließschema zusammengefasst, um das Zusammenspiel der verschiedenen Aspekte zu verdeutlichen.



*Logisches Fließschema zu den Aufgaben im Zusammenhang mit der Herstellung der TNT-Affinitätssäulen.*



# 1 Einsatz von Antikörpern zur Detektion organischer Sprengstoffe

In diesem Kapitel werden die wesentlichen chemischen Eigenschaften von Nitropenta (PETN) und Trinitrotoluol (TNT) sowie deren Detektionsmöglichkeiten im Umwelt- und Sicherheitsbereich beschrieben. Die prinzipielle Gewinnung von Antikörpern wird umrissen und der Begriff bzw. das Konzept der Isosterie und der Bioisosterie wird erläutert, welches in dieser Arbeit zur Gewinnung der anti-PETN-Antikörper angewandt wurde. Abschließend wurden die bereits in der Literatur bzw. kommerziell erhältlichen Antikörper gegen TNT und PETN zusammengestellt.

## 1.1 Organische Sprengstoffe: Trinitrotoluol (TNT) und Nitropenta (PETN)

### 1.1.1 TNT

*Wilbrand* synthetisierte und beschrieb TNT erstmalig 1863 [1]. 1891 begann in Deutschland die TNT-Produktion und ab 1901 wurde es großtechnisch nach dem preiswerten Verfahren von *Haeußermann* hergestellt. Daraufhin wurde 1902 die bisher verwendete Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol) bei der Sprengstoffproduktion durch TNT abgelöst und die preußische Heeresverwaltung führte die Verbindung als Sprengladung ein [2]. Während des Ersten und Zweiten Weltkrieges wurde TNT massenweise produziert. Allein im Zweiten Weltkrieg wurden von der deutschen Rüstungsindustrie 0,8 Millionen Tonnen TNT hergestellt [3]. Durch die extensive TNT-Produktion während des 20. Jahrhunderts sind auch erhebliche Umweltbelastungen entstanden. Die Gegenden um die ehemaligen Produktions- und Lagerungsstätten sind immer noch hochgradig mit TNT und dessen Abbauprodukten kontaminiert. Ein Grund dafür ist, dass im Zuge der TNT-Produktion Unmengen an saurem, sprengstoffhaltigem Abwasser nur neutralisiert und zu Kriegszeiten ungereinigt in die Umwelt geleitet wurden. Da TNT schwerlöslich und nur gering flüchtig ist, gelangten diese Kontaminationen über Jahrzehnte durch Leaching-Prozesse in die Böden und in das Grundwasser, sofern keine Dekontamination der Gebiete erfolgte. Auch nicht geborgene Landminen und andere Munition stellen eine Kontaminationsquelle dar [4-8]. TNT ist eine synthetische nitroaromatische Substanz, welche nicht natürlich in der Umwelt vorkommt und auch nur schwer biologisch abgebaut wird. Zahlreiche Studien belegen, dass die Biodegradation vor allem zur Akkumulation von Hydroxylamino-dinitrotoluol, Aminodinitrotoluol und Dinitrotoluol führt [4, 9]. Die mittlere letale orale Dosis (LD50) von TNT ist 0,8 bis 1,3 g/kg [10], ab einer Konzentration von 2 µg/L wird TNT von der Environmental Protection Agency (EPA) als toxisch klassifiziert. Die Substanz wird als potenziell mutagen und karzinogen eingestuft [8, 11]. Außerdem wurde über weitere gesundheitliche Auswirkungen durch TNT-Kontakt berichtet: Haut- und Schleimhautirritationen, Leberschäden, Ausbildung aplastischer Anämien, hervorgerufen durch Schädigung der Erythrozyten, Entfärbung der Haut und der Haare. Auch wurde bei Personen mit einer Störung des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase die Ausbildung einer hämolytischen Anämie beobachtet. Einige Studien proklamieren zudem, dass der Kontakt mit TNT zur Wahrnehmung eines bitteren Geschmacks und zum Brennen der Augen bis hin zur Ausbildung von Katarakten führen kann. Ebenso wird eine Reduktion des Spermiengehaltes mit TNT in Zusammenhang gebracht [8, 12, 13].

### 1.1.2 PETN

PETN (Nitropenta, Pentaerythrityltetranitrat) wurde bereits 1894 von der Rheinisch-Westfälischen Sprengstoff AG hergestellt, kurz nach der Erstsynthese von *Tollens und Wiegand* 1891 [14]. Großtechnisch wird PETN seit 1926 aus Pentaerythrit hergestellt und wird für Sprengkapseln, -schnüre sowie für hochbrisante Geschossfüllungen verwendet. In Kombination mit TNT wird es als Pentolit vertrieben (für kleinere Kaliber), mit Phlegmatisierungsmitteln wie Wachs nutzt man PETN für Handgranatenladungen. Zusammen mit Plastifizierungsmitteln und Weichmachern entsteht aus PETN Plastiksprengstoff (plastischer Sprengstoff), der sich – leicht formbar – zum Anbringen von Sprengladungen an schwer zugänglichen Stellen eignet. Er ist bei terroristischen Vorhaben nur schwer auffindbar. Der Plastiksprengstoff *Semtex* wurde 1966 von *Stanislav Brebera* entwickelt (Hauptbestandteile PETN, Hexogen, Styrol-Butadien-Kautschuk) und wird sowohl militärisch als auch für kommerzielle Sprengungen verwendet [15]. Strukturell ähnelt PETN Nitroglycerin, das pharmakologische und explosive Eigenschaften besitzt. So werden PETN und Nitroglycerin als Medikament bei *Angina pectoris*, Herzinsuffizienz, sowie bei Analfissuren wegen seiner gefäßerweiternden Wirkung durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, verwendet. PETN ist sehr schlecht in Wasser löslich, wenig löslich in Ethanol und Benzol, jedoch gut löslich in Aceton. Genauso wie Nitroglycerin ist die Substanz im chemischen Sinn keine Nitroverbindung, sondern ein Nitrat, also ein Ester der Salpetersäure [16, 17].

Abschließend sind einige Kenndaten von TNT und PETN in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

*Tabelle 1.1: Kenndaten und Eigenschaften von TNT und PETN.*

	TNT	PETN
Summenformel	$C_7H_5N_3O_6$	$C_5H_8N_4O_{12}$
CAS-Nummer	118-96-7	118-96-7
Molmasse	227,13 g mol <sup>-1</sup>	316,15 g mol <sup>-1</sup>
Schmelzpunkt	80,8°C	141,0-142,9°C
Siedepunkt	Zersetzung ab 160°C, ohne Zersetzung: 240°C bei 67 hPa	180°C
Verpuffung	ab 300°C	202-205°C
Dichte	Kristall: 1,65 g cm <sup>-3</sup> geschmolzen: 1,47 g cm <sup>-3</sup>	1,778 g cm <sup>-3</sup> bzw. 1,716 g cm <sup>-3</sup> (136°C)
Dampfdruck	$7,5 \times 10^{-4}$ Pa (20°C)	$2,5 \times 10^{-7}$ Pa (20°C)
Löslichkeit in Wasser	100,5 mg L <sup>-1</sup> (25°C, pH 6.8)	nahezu unlöslich
Gut löslich in	Benzol, Toluol, Aceton, Chloroform	Aceton, Methylacetat
Schwer löslich in	Ethanol, Tetrachlormethan	Ethanol, Tetrachlormethan
Sauerstoffbilanz	-73,9%	-10,1%
Stickstoffgehalt	18,50%	17,7%
Bleiblockausbauchung	30 cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	52,3 cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>
Schlagempfindlichkeit	15 nm	3 nm
Reibempfindlichkeit	keine Reaktion bis 353 N Stiftbelastung	keine Reaktion bis 60 N Stiftbelastung
Detonationsgeschwindigkeit	6900 m s <sup>-1</sup>	8400 m s <sup>-1</sup>
Kristalle	farblos bis gelb, orthorhombisch oder monoklin	farblos, tetragonal oder orthorhombisch
Sonstiges	toxisch; krebserzeugendes Potenzial	Medizinischer Wirkstoff

*Literatur: [18-21]*

## 1.2 Detektionssysteme zum Nachweis von Sprengstoffen

### 1.2.1 Umweltanalytik

Durch Untersuchungen von Boden und Grundwasser auf TNT-Kontamination können Altlasten geortet werden und gezielte Sanierungsmaßnahmen eingeleitet werden. Auch Blindgänger werden u. U. so entdeckt und einer fachgerechten Entsorgung zugeführt. Häufig werden hierzu kolorimetrische TNT-Schnelltests verwendet, deren Durchführung einige Minuten bis zu einer halben Stunde dauern und deren Detektionsgrenzen zwischen 0,1 und 3 mg/L liegen [22]. Der Nachweis erfolgt häufig über das gefärbte *Meisenheimer*-Anion, das durch Umwandlung von TNT durch starke Basen (NaOH, MgO oder CaO) entsteht oder durch das *Janowsky*-Anion, das bei zusätzlicher Anwesenheit von Aceton gebildet wird. Beide Anionenkomplexe sind intensiv rot gefärbt. Außer TNT reagieren aber auch andere Nitroaromaten mit NO<sub>2</sub>-Gruppen in 1,3-Position auf die gleiche Art, was die Methode verhältnismäßig unselektiv macht.

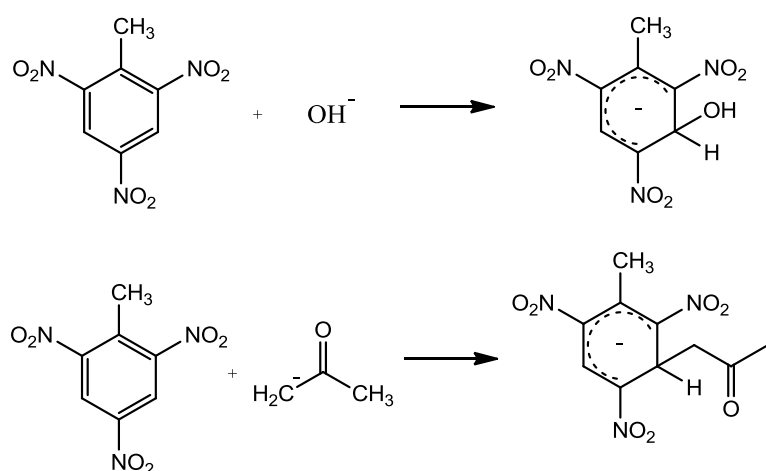


Abbildung 1.1: Reaktionsschema der Bildung von Meisenheimer-Ionen (oben) und Janowsky-Ionen (unten).

Selektiver und empfindlicher sind die Nachweise, die Antikörper verwenden. Beim ELISA werden in der Regel mehrere Proben gleichzeitig getestet, sodass dies eine leistungsstarke Screening-Methode ist, die in der Praxis ebenfalls häufig zum Einsatz kommt (Kap. 2).

Im Labor kann der klassische TNT-Nachweis durch Analyse der Probe mit Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (PR-HPLC) und Messung der UV-Absorption bei 230 nm erfolgen [23]. Die Nachweisgrenze liegt bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors (DAD) bei 0,1 µg/L [24]. Durch Anreicherungsverfahren wie Flüssig-Flüssig-Extraktion, Solid Phase Extraction (SPE) und Supercritical Fluid Extraction (SFE) kann die Empfindlichkeit gesteigert werden [25]. Gaschromatisch lässt sich TNT mit einer Nachweisgrenze von 0,1 µg/L mit einem Electron Capture Detector (ECD) bestimmen [26].

Eine schnelle Detektion mittels IR-Absorptionsspektroskopie erfolgt über die starken Absorptionsbanden der Nitrogruppen (symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen,  $\nu_s$ : 1400-1360 cm<sup>-1</sup> und  $\nu_{as}$ : 1590-1550 cm<sup>-1</sup>). Da diese jedoch bei allen nitrohaltigen Sprengstoffen zu beobachten sind, ist auch dieser Nachweis relativ unspezifisch. Für die Messung, die in der Gasphase erfolgt, wird ein hoher Dampfdruck des Analyten benötigt, um gute Nachweisgrenzen zu erreichen [27]. Wird eine Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction, SPME) der IR-Spektroskopie vorgeschaltet, lässt sich TNT in Wasser mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/L nachweisen [28].

### 1.2.2 Sicherheitsbereich

Neben der Analytik von Altlasten werden hochselektive und empfindliche Nachweisverfahren im Sicherheitssektor benötigt, z. B. am Flughafen für Passagier- und Gepäckkontrollen, bei Fahrzeug- oder Personenkontrollen oder bei der Überwachung von durch Terrorismus gefährdeten Gebäuden oder Einrichtungen. Die EU-Verordnung 185/2010 schreibt vor, ab September 2015 Passagiere und deren Handgepäck an allen europäischen Verkehrsflughäfen auf Spuren von Sprengstoff zu untersuchen [29]. Nach Inkrafttreten dieser Verordnung war die Sprengstoffdetektion im Flughafensicherheitsbereich noch nicht zufriedenstellend gelöst. Am Flughafen München wurden aufgrund der Verordnung zwei Arten von Detektoren eingesetzt, der Quantum Sniffer QS-B 220, der Sprengstoffe mittels der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) nachweist [30], und der Detektor Itemiser 4DX, welcher als Ion Trap Mobility Spectrometer (ITMS) konstruiert ist [31]. Der Einsatz dieser Geräte führte zum Verdacht einer erhöhten Konzentration flüchtiger organischer Verbindungen, insbesondere Formaldehyd in der Umgebungsluft mit Folge krankheitsbedingter Ausfälle des Sicherheitspersonals [32, 33].

Terroristische Anschläge unter Verwendung von TNT – erworben auf dem Schwarzmarkt oder aus militärischen Arsenalen gestohlen – geschehen häufig [34]. Internationale Zeitungen berichten regelmäßig über derartige Attacken. TNT wurde beispielsweise 2012 vom Bargas-Bus-Bomber bei seinem Attentat auf einem bulgarischen Flughafen verwendet, bei dem sechs Personen getötet wurden. [35]. Einige solcher terroristischen Anschläge könnten verhindert werden, wenn adäquate Detektoren für das Sicherheitspersonal zur Verfügung stünden. Der Nachweis muss schnell und möglichst ohne falsch positive Ergebnisse durchführbar sein. Es gibt viele verschiedene Verfahren zur Detektion von Sprengstoffen [36-38]. Die derzeit effektivste und effizienteste Methode ist noch immer der Einsatz von Spürhunden, die Sprengstoffe oder Markierungsmittel in der Gasphase wahrnehmen können [11]. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass das Training mit Pseudo-Explosivstoffen bei Hunden zu einer schlechten Erfassung von echtem Sprengstoff führt [39]. Da der Dampfdruck vieler Sprengstoffe gering ist, können auch Hunde nicht in allen Fällen eine Erkennung garantieren [34]. Hinzu kommt, dass die Ausbildung solcher Hunde sehr teuer und zeitaufwendig ist, sodass Alternativen benötigt werden [40]. Anforderungen an die Detektionssysteme sind Schnelligkeit, hohe Selektivität sowie ein einfacher Umgang und geringe Kosten. Chemischen Methoden fehlt es häufig an Selektivität, daher bieten sich immunchemische Verfahren an, deren Grundlage ein hochselektiver Antikörper ist. Der Antikörper bindet selektiv und mit hohen Affinitäten an dem Zielmolekül. Kombiniert mit einem geeigneten Detektionsverfahren kann dieses Bindungsereignis nachgewiesen werden. Den ersten TNT-Immunoassay entwickelten *Little und Eisen* [41]. Dieser basierte auf Fluoreszenz-Quenching unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern, d.h. die Konzentrationsbestimmung erfolgt aufgrund der Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors. Es wurden und werden weiterhin verschiedenste Immunosensoren entwickelt, die auf optischen Verfahren basieren. Insbesondere zu nennen sind Fluoreszenz [42], Chemilumineszenz [43], Surface Plasmon Resonance (SPR) [44] und Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) [45]. Am häufigsten wird jedoch der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet (Kap. 2.1). Aufgrund der intensiven Forschung an Sensorsystemen zur Detektion explosiver Stoffe existieren viele Review-Artikel, die die Fortschritte auf diesem Gebiet zusammenfassen. So gibt *Singh* einen Überblick über chemisch basierte Sensorsysteme, aber auch Biosensorsysteme für die Detektion von Sprengstoffen [11]. *Smith et al.* [46] legt den Fokus auf Biosensoren und bioanaloge Systeme. In diesem Review werden verschiedene Immunoassay-Formate, enzymatische Sensoren, biomimetrische Sensoren, Zell-Biosensoren und Gasphasendetektionstechniken vorgestellt. *Caygill* zeigt die derzeitigen Trends in der Explosivstoffdetektion auf [38]. Unter anderem werden auch Fortschritte im Bereich der Nanotechnologie dargestellt – ein wachsendes Gebiet der letzten Jahre. Auch diese Techniken können biobasiert sein

[47]. Die Analysezeiten der immunchemischen Methoden reichen von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden und die Nachweisgrenzen können unter günstigen Voraussetzungen im unteren ppt-Bereich liegen. Die Qualität eines Immunosensors hängt entscheidend vom verwendeten Antikörper ab. Immunoassays und Immunosensoren mit geeigneten Antikörpern [5, 48, 49], zeigen sehr gute analytische Ergebnisse, niedrige Nachweisgrenzen und praktisch keine Kreuzreaktionen. Da fast alle organischen Sprengstoffe kleine Moleküle sind, werden zur Erzeugung von Antikörpern Designstrategien für die entsprechenden Haptene benötigt (Kap. 1.3) [50, 51].

Die Detektion von Pentaerythrittrinitrat (PETN) ist besonders schwierig. Wegen seines sehr geringen Dampfdrucks [52] ist es Hunden fast unmöglich, die Verbindung aufzuspüren. Ebenso versagt die massenspektrometrische Detektion. PETN ist die Hauptkomponente des Plastiksprengstoffs *Semtex* [53, 54]. Um Plastiksprengstoff besser auffinden zu können, werden daher Geruchsstoffe oder Metallspäne während der Herstellung beigemischt. Die Verwendung dieses Explosivstoffs durch Terroristen stellt weiterhin ein Sicherheitsproblem dar. Am 29. Oktober 2010 wurden zwei Tonerkartuschen für einen Laserdrucker auf zwei getrennten Frachtflugzeuge in Großbritannien und in Dubai gefunden [55]. Die Patronen enthielten Bomben auf Basis von pulverförmigem PETN. Die Bomben waren bereits von mehreren Flugzeugen transportiert worden und wurden nur durch einen spezifischen Hinweis, aber nicht durch Routineüberprüfungen der jeweiligen Flughäfen entdeckt. Das Beispiel verdeutlicht, wie dringlich die Nachweisbarkeit von PETN verbessert werden muss. Doch um analog zu TNT auch für PETN immunchemische Nachweismethoden zu entwickeln, werden zunächst geeignete Antikörper benötigt.

## 1.3 Antikörperentwicklung gegen Sprengstoffe

### 1.3.1 Antikörper

Antikörper sind globuläre Glykoproteine, die als Teil des adaptiven Immunsystems, genauer der humoralen Immunantwort, Antigene erkennen, binden und so spezifisch abwehren. Etwa 75% der Antikörper im Serum (ca. 10 mg/mL) sind Immunglobuline der Klasse G (IgG) [56, 57], sodass meist IgG gemeint sind, wenn allgemein von Antikörpern gesprochen wird. Dieser Typ wird von den B-Zellen des Immunsystems produziert. Das ubiquitär auftretende IgG ist als einzige Immunglobulinklasse plazentagängig und außer im Blutserum auch in der Extrazellulärflüssigkeit und den Epithelien [56], vor allem des Gastrointestinaltrakts zu finden [58, 59].

Der prinzipielle Aufbau eines IgGs ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Es handelt sich um ein formal achsensymmetrisches Heterotetramer aus jeweils zwei molekular identischen schweren ( $\sim 50$  kDa) und leichten ( $\sim 22$  kDa) Polypeptidketten. Diese sind kovalent durch Disulfidbrücken sowie durch weitere nicht-kovalente Bindungen verbunden und bilden die typische Y-förmige Tertiärstruktur [56, 60]. Antikörper werden in konstante und variable Regionen eingeteilt. Die konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten werden bei immunchemischen Methoden genutzt, um Spezies-spezifische Antikörper durch sekundäre Antikörper ( $\alpha$ -IgG) zu binden. Dazu wird nicht selten auch nur der untere Abschnitt der konstanten Region verwendet (der den Carboxy-Terminus tragende Bereich), der aus dem kristallisierbaren Teil ( $F_c$ ) der konstanten Domänen der beiden schweren Polypeptidketten besteht.

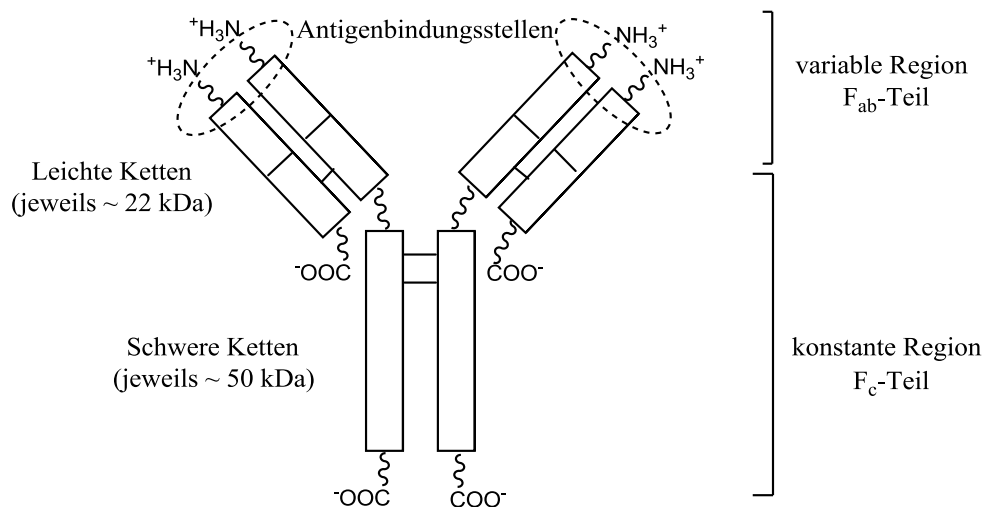


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Antikörpers (IgG).

Der für Immunoassays und auch für die Immunabwehr entscheidende Teil, die Antigenbindungsstelle, wird im Bereich der Amino-Termini der variablen Domänen von einer schweren und einer leichten Kette gebildet. Diese Antikörper-Antigen-Bindung basiert auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Antikörperseite (Paratop) und den Strukturen auf der Antigenseite (Epitop). Dabei wirken u. a. elektrostatische Kräfte, van-der-Waals-Kräfte, Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und sogenannte hydrophobe Wechselwirkungen. Kovalente Bindungen werden nicht gebildet. Die variable Domäne verfügt dabei über eine gewisse Flexibilität und geht erst nach der Bindung mit dem Antigen in eine stabilere Konformation über, die eine passende Form zur Antigenstruktur darstellt. Aus dem funktionell symmetrischen Aufbau der Antikörper resultiert eine Bivalenz, über die die Antikörper verfügen, d. h. sie besitzen zwei iden-

tische Antigenbindungsstellen mit derselben Bindungsspezifität. Für Säugetiere wird angenommen, dass sie durch Rekombination der Gene der variablen Region und alternatives Spleißen der Gentranskripte mindestens  $10^6$  bis  $10^7$  verschiedene Antikörperspezifitäten hervorbringen können [56, 61].

### 1.3.2 Antikörper gegen kleine Moleküle (Haptene)

Durch Hyperimmunisierung von Tieren mittels wiederholter subkutaner Injektion eines Immunogens, können polyklonale Antikörper generiert werden. Zu beachten ist, dass das Immunsystem erst auf Moleküle mit einer Mindestgröße von 1500 bis 5000 Da reagiert [60, 62]. Daher sind Sprengstoffe als Immunoge aufgrund der geringen Molekülgröße ungeeignet. Bindet man aber kleine Moleküle (Haptene) an ein größeres – den sogenannten Carrier – kann eine Immunantwort ausgelöst werden (Hapten-Carrier-Prinzip) [63]. Um dies zu realisieren, muss der Analyt häufig chemisch derivatisiert werden, damit eine funktionelle Gruppe zur Kopplung an den Carrier zur Verfügung steht. Als Carrier hat sich Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) bewährt [5, 49]. Bei der Modifizierung des Analyten muss bedacht werden, dass auch leichte Veränderungen zu Affinitätseinbußen und unerwünschten Kreuzreaktivitäten bei den Antikörpern führen können. Daher sollten die sterischen und elektronischen Charakteristika des Target-Moleküls soweit wie möglich imitiert werden.

Als funktionelle Gruppe des Haptens wird häufig eine Säuregruppe verwendet, die mit den Amino- gruppen der zugänglichen Lysine im BSA eine stabile Amidbindung bilden kann. Um eine rasche Reaktion zu ermöglichen wird die Carboxylgruppe mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu einem aktivierten Ester umgewandelt [64, 65]. Damit das Hapten vom Immunsystem besser erkannt werden kann, wird zusätzlich ein „Abstandshalter“, genannt Spacer, verwendet, der das Targetmolekül aus der Oberfläche herausragen lässt (Abb. 1.3).

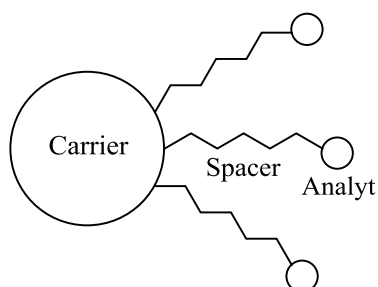


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Hapten-Carrier-Immunogens.

Der Spacer sollte keine weiteren Gruppen außer der funktionellen Gruppe zum Koppeln besitzen, da die Veränderung der Polarität und Ladungsverteilung direkt die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen würde. Die Länge des Spacers gilt es ebenfalls zu optimieren, da ein zu kurzer Spacer das Molekül teilweise in der Proteinstruktur untergehen ließe, ein zu langer hingegen keine ausreichend rigide Struktur zeigte, was zu einer Affinitätsschwächung führen könnte. Um eine gute Immunantwort zu erhalten, wird versucht, möglichst viele Haptene an ein Protein zu binden, damit das Immunsystem das gewünschte Epitop leicht erkennen kann. Die durch dieses Verfahren gebildeten Antikörper richten sich sowohl gegen das Hapten als auch gegen das Carrierprotein [66, 67].

### 1.3.3 PETN-Haptene, Isosterie und Bioisosterie

PETN ist ein hochsymmetrisches Molekül und besitzt lediglich Nitratgruppen und keine geeigneten Anknüpfungsstellen für einen Spacer. Die wenigen Versuche, die in der Literatur dokumentiert sind,

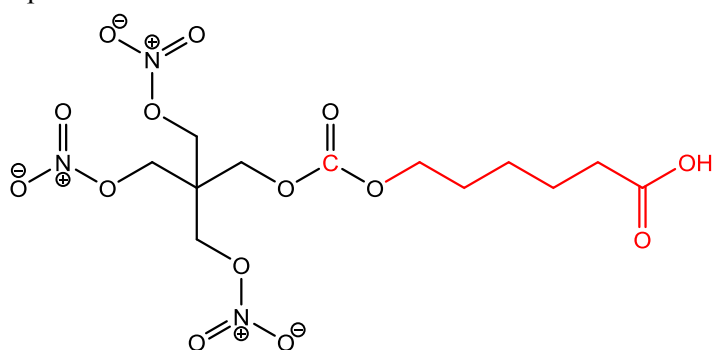
in denen ein PETN-Derivat zur Immunisierung verwendet wurde, nutzten Pentaerythrittrinitrat (PETriN), ein Nebenprodukt der Synthese von PETN. Es trägt nur drei Nitroester und eine Hydroxylgruppe. Letztere kann für chemische Derivatisierung genutzt werden. Die bisher dokumentierten PETN- Antikörper, zeigen nur eine moderate Affinität und Selektivität zu PETN. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, ein Hapten basierend auf einem bioisosteren Ersatz zu entwerfen. Ein Ansatz, der häufig in der Pharmazie, nicht aber für die Immunoassay-Entwicklung verwendet wurde [68-70].

Isostere (isoelektronische) Verbindungen besitzen eine identische Atom- und Gesamtelektronenzahl. Sie zeichnen sich, falls die Kernladungssummen übereinstimmen, durch eine auffallende Ähnlichkeit in ihren physikalischen Eigenschaften aus [71]. Dieses Konzept der Isosterie wurde 1919 vom Physikochemiker *Langmuir* [72] eingeführt und erfuhr 1925 eine Erweiterung durch eine als *Grimm'scher* Hydridverschiebungssatz [73, 74] bekannt gewordene Regel. Diese besagt, dass Atome durch Aufnahme von n Wasserstoff-Atomen ( $n = 1, 2, 3$  oder  $4$ ) die Eigenschaften der im Periodensystem um n Ordnungszahlen höheren Atome annehmen. In den 1930-iger Jahren veröffentlichte Erlenmeyer einige detaillierte Studien über das Isosteriekonzept. Er definierte Isostere als Atome, Ionen oder Moleküle bei denen nur die periphere Elektronenschale (gleiche Gesamtzahl der Außenelektronen) identisch sind [75].

Unter dem von *Friedman* 1951 geprägten Begriff Bioisosterie versteht man eine Erweiterung des Isosterie-Konzeptes. Es erfolgt ein Ersatz von Atomen oder Atomgruppen durch andere Funktionalitäten, welche die oben genannten Isosteriedefinitionen nicht vollständig erfüllen müssen, im Organismus aber eine ähnliche biologische Aktivität entfalten. Der bioisostere Ersatz von Atomen und funktionellen Gruppen war und ist eine der wichtigsten Strategien in der Arzneimittelforschung [76-78]. Erstmals wurde 1933 ein ähnliches biologisches Verhalten von Benzol und Thiophen beschrieben [79]. Thiophen und Benzol wurden an Serum-Eiweiß (Schweine-Serum) gekoppelt und die Antikörperproduktion untersucht. Die induzierten spezifischen Antikörper banden gleichermaßen an die antigen-determinante Gruppe Benzol wie an Thiophen. Benzol und Thiophen besitzen also vergleichbare biologische Eigenschaften; sie verhalten sich bioisoster zueinander [80].

Nach diesem Konzept wurde in dieser Arbeit erstmalig ein Nitroester durch einen Carbonatdiester ersetzt (Abb. 1.4).

Hapten:



Analyt:

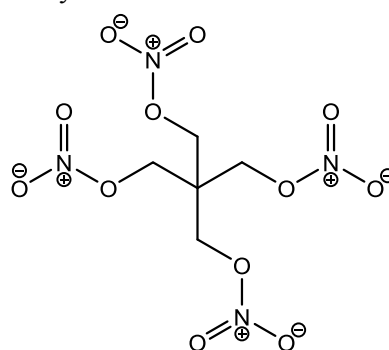


Abbildung 1.4: PETN-Hapten und Analyt (PETN): neues Hapten mit einer Carbonatdiester-Gruppe, Entwurf basiert auf einem isosterischen Ersatz, rot: Strukturelle Unterschiede zum Analyten.

Der Vorteil dieser Substitution ist die durch das Konzept bedingte hohe Ähnlichkeit zwischen Hapten und Analyt, außerdem die gute synthetische Verfügbarkeit (über aktivierte Carbonat-Derivate) und eine ausreichende chemische Stabilität der Verbindungen [81].



## 1.4 Antikörperbibliothek für TNT und PETN

Zwar wurden Immunoassays mit Antikörpern gegen die Explosivstoffe TNT [5, 7, 82-89], RDX [90] und PETN [91, 92] mehrfach beschrieben, jedoch kam es trotz der schon 1996 durch die Umweltschutzbehörde der USA (EPA) für TNT [93] und RDX [94] herausgegebenen Methoden bislang nicht zu einem breiten, kommerziellen Einsatz.

### 1.4.1 Anti-TNT-Antikörper

Es gibt eine Vielzahl von polyklonalen und monoklonalen anti-TNT-Antikörpern mit unterschiedlichen Testmittelpunkten und Nachweisgrenzen (Tab. 1.2, 1.3).

*Tabelle 1.2: Übersicht verschiedener monoklonaler anti-TNT-Antikörper mit deren Testmittelpunkten ( $IC_{50}$ ) und Nachweisgrenzen (LOD) der kompetitiven Assays [95].*

Antikörper	Autor	Immunogen	Methode	$IC_{50}$ [ $\mu$ g/L]	LOD [ $\mu$ g/L]
von TSD Bioservices	<i>Bowen</i> [82]	-	SPR (Gasphase)	-	73 ppm
A1.1.1 von Strategic Biosolutions	<i>Green</i> [88]	TNP-Glycin-KLH	Reversed-displacement immunosensor	-	2,5
von Strategic Diagnostics Inc	<i>Keuchel</i> [83]	-	ELISA	4,5	
A1.1.1 von Strategic Diagnostics Inc	<i>Zeck</i> [7]	TNP-Glycin-KLH	ELISA	0,34	0,06
A1.1.1 von Strategic Biosolutions	<i>Charles</i> [84]	-	ELISA	5,3	0,095
M-TNT Ab von Strategic Biosolutions	<i>Shankaran</i> [85]	TNP-BSA	SPR	0,7	0,008
M-TNP von Biomeda 10A11	<i>Shankaran</i> [85]	TNP-OVA	SPR	-	0,04
11B3	<i>Bromage</i> [86]	TNP-KLH	Fluoreszenz	-	0,05
	<i>Whelan</i> [87]	TNP-OVA	Continuous flow	-	2,5
DNT4 3F6	<i>Krämer</i> [89]	3-(4-A-2,6-DNP)-PA-KLH	ELISA	0,26	0,02
DNT4 4G4	<i>Krämer</i> [89]	3-(4-A-2,6-DNP)-PA-KLH	ELISA	0,35	0,02
DNT4 1A3	<i>Krämer</i> [89]	3-(4-A-2,6-DNP)-PA-KLH	ELISA	0,73	0,05
DNT4 1A7	<i>Krämer</i> [89]	3-(4-A-2,6-DNP)-PA-KLH	ELISA	2,32	0,11
2E3	<i>Charles</i> [84]		ELISA	295	6,1
30-1	<i>Charles</i> [84]	TNP-KLH	ELISA	169	1,5
5-1	<i>Charles</i> [84]	TNP-OVA	ELISA	259	6,1

mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper

TNP: Trinitrophenyl, 3-(4-A-2,6-DNP)-PA: 3-(4-Amino-2,6-dinitrophenyl)propionsäure, KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (bovine serum albumin), OVA (ovalbumin)

Bei den ersten fünf monoklonalen Antikörpern könnte es sich um denselben Antikörper handeln, da alle Hersteller zum selben Unternehmen gehören (Strategic Diagnostics Inc. USA bzw. dessen Tochterfirmen) und die Bezeichnung der Antikörper teilweise identisch ist.

Tabelle 1.3: Übersicht verschiedener polyklonaler anti-TNT-Antikörper mit deren Testmittelpunkten ( $IC_{50}$ ) und Nachweisgrenzen (LOD) der kompetitiven Assays [95].

Antikörper	Autor	Immunogen	Methode	$IC_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	LOD [ $\mu\text{g/L}$ ]
von Serva	Keuchel [83]	TNP-Konjugat	ELISA	0,35	0,02
P-TNP Ab von BD Biosciences	Shankaran [85]	TNP-OVA	SPR	-	0,25
P-TNPh Ab	Shankaran [85]	TNP-KLH	SPR	0,3	0,002
K1B9	Ramin [5]	TN6PHA-BSA	ELISA	0,1	0,007
K2B12	Ramin [5]	TN6PHA-BSA	ELISA	0,1	0,007

TNP: Trinitrophenyl, KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (bovine serum albumin), OVA (ovalbumin)

In dieser Arbeit kamen nach der Methode von Ramin hergestellte polyklonale anti-TNT-Antikörper zur Anwendung. Um ein Immunogen mit optimalen strukturellen Charakteristika zu erzeugen, wurde 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (6-TNPHA) (Abb. 1.5) synthetisiert und an das Trägerprotein BSA gekoppelt. Nahezu die komplette Struktur des TNT-Moleküls ist in diesem Hapten vorhanden. Es liegen keine zusätzlichen oder fehlenden Ladungen vor. Minimale elektronische Effekte aufgrund der virtuellen Verlängerung durch den apolaren Linker, können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

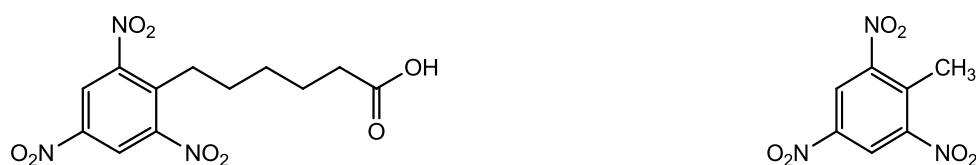


Abbildung 1.5: Chemische Struktur von 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure und von TNT.

Es wurden zwei Kaninchen mit 6-TNPHA-BSA immunisiert, um polyklonale anti-TNT-Antikörper zu generieren. Seren von Kaninchen 1 Boost 9 (K1B9, nach der 9. Injektion des TNT-Immunogens) und Kaninchen 2 Boost 12 (K2B12, nach der 12. Injektion des TNT-Immunogens) wurden für die Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Bindungskonstanten betragen  $5,1 \cdot 10^9$  L/mol (Kaninchen 1) bzw.  $2,3 \cdot 10^9$  L/mol (Kaninchen 2) [5].

#### 1.4.2 Anti-PETN-Antikörper

Vor über 20 Jahren wurde ein US-Patent von der Westinghouse Electric Company eingereicht. Es beschreibt ein "Verfahren zum Nachweis von Nitratestern" und die Herstellung von Antikörpern gegen PETN [96]. Als Nachweisgrenze wurde zwar optimistisch  $0,03 \mu\text{g/L}$  PETN angegeben, die Auswertung der präsentierten Kalibrierkurve legt jedoch eine Nachweisgrenze von lediglich  $1 \mu\text{g/L}$  nahe. Die Antikörper haben eine sehr hohe Kreuzreaktivität mit Nitroglycerin. Kreuzreaktivitäten zu weiteren Verbindungen wurden nicht getestet [97]. Das Patent zeigt die Verwendung von Pentaerythrittrinitrathemiglutarat und schlug die Verwendung anderer Dicarbonsäureanhydride zur Modifizierung von Pentaerythrittrinitrat (PETriN) vor. Ein monoklonaler Antikörper auf der Grundlage der Immunisierung von Pentaerythrittrinitrathemisuccinat wurde von den Forschern des DSTL (Kent, UK) hergestellt. Der Antikörper wurde in einer Veröffentlichung von Blackburn *et al.* erwähnt [68], zu diesem wurden jedoch keine weiteren Angaben gemacht. Die monoklonalen Antikörper wurden durch Wilson *et al.* [91] für einen Elektrochemilumineszenz-Enzymimmunoassay verwendet und erreichten eine Nachweisgrenze von etwa  $20 \mu\text{g/L}$  [98].

## 2 Affinitätsmethoden

Affinitätsmethoden gewinnen zunehmend in der Analytik an Bedeutung. Diese beruhen typischerweise auf einer Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor. Zu Beginn wird der Enzymgekoppelte Immunoassay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) vorgestellt, sowie mögliche Anwendungen und deren Auswertung aufgeführt. Als weiteres Verfahren wird die Affinitätschromatographie beschrieben, die häufig die Selektivität der Antikörper für die benötigte Ligand-Rezeptor-Bindung nutzt. Im Anschluss werden die in dieser Arbeit verwendeten und aus der Literatur bekannten Immobilisierungsreaktionen aufgeführt.

### 2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

#### 2.1.1 Prinzip

Der erste Immunoassay wurde von *Yalow und Berson* [99] veröffentlicht und nutzte die Radioaktivität künstlicher Antigene zur Detektion (Radioimmunoassay, RIA). Dieser Assay wurde für medizinische Messungen vielfach zur Quantifizierung variiert [100]. Inzwischen wird am häufigsten der ELISA verwendet. Er kommt nicht nur bei klinischen und biochemischen Untersuchungen zum Einsatz, sondern wird auch bei der Gewinnung von Antikörpern [101] und in der Umweltanalytik als schnelle und kostengünstige Methode verwendet [51, 102-104]. Beim ELISA werden enzymgekoppelte Antigene bzw. Antikörper anstelle von radioaktiven Isotopen (meist  $^{125}\text{I}$  oder  $^3\text{H}$ ) zur Markierung eingesetzt [62]. Eine durch die Enzyme katalysierte Reaktion führt zu einer Verstärkung (Amplifikation) des Signals, was die hohe Empfindlichkeit des ELISAs ermöglicht. So können Immunoassays theoretisch eine Empfindlichkeit von  $10^{-15}$  bis  $10^{-16}$  mol/L bzw. in der kompetitiven Variante bis zu  $10^{-14}$  mol/L erreichen [105]. 1971 wurden bei den ersten ELISAs alkalische Phosphatase und als homogenes Substrat *p*-Nitrophenylphosphat von *Engvall und Perlmann* [106] eingesetzt. *Avrameas und Guilbert* [107] nutzten Meerrettich-Peroxidase (POD, HRP) mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ /*o*-Dianisidin (3,3'-Dimethoxybenzidin) als chromogenes Substrat. Beide Enzyme werden noch heute verwendet, seltener werden  $\beta$ -Galactosidase, Glucoseoxidase und andere eingesetzt. Diverse Chromogene, wie z. B. 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS), wurden verwendet, wobei die höchste Empfindlichkeit für chromogene Substrate mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) für HRP erreicht wurde [62, 105], das auch für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten PETN-ELISA verwendet wird. Mit fluorimetrisch nachweisbaren Substraten wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure für HRP oder 4-Methylumbelliferylphosphat lässt sich die Testempfindlichkeit um das Zwei- bis Zehnfache erhöhen [62, 105, 108]. Die Sensitivität von Chemilumineszenzassays ist noch höher. Luminol und seine Derivate sind klassische Substrate bei der Chemilumineszenzreaktion und werden auch bei Immunoassays verwendet. Für ihre Reaktion werden Katalysatoren benötigt, wodurch zusätzliche Störfaktoren geschaffen werden. Weitere brauchbare Marker für Immunoassays stellen Acridinester dar, die keinen Katalysator zur Reaktion benötigen und somit robuster sind [109].

Der in dieser Arbeit entwickelte PETN-ELISA ist ein direkter, kompetitiver Assay, wobei die Verwendung der Begriffe „direkt“ und „indirekt“ in der Literatur nicht einheitlich ist. Der folgende kompetitive Ansatz ist für kleine Moleküle geeignet, da aufgrund des kleinen Molekulargewichtes nur jeweils ein einzelner Antikörper an diesem Molekül binden kann [46]. Der ELISA ist ein Festphasenassay und wird in Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol durchgeführt, die eine hohe

Bindekapazität für Proteine haben. Die Adsorption der Proteine beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen [62]. Im direkten Assay werden die Analyt-spezifischen Antikörper auf dem Träger immobilisiert. Hierzu wird ein sekundärer Antikörper (anti-Kaninchen-IgG) unspezifisch adsorptiv auf einer MTP immobilisiert (Beschichtung, langsamster Schritt: Inkubationszeit ca. 10 h), der die Antikörper aus dem Serum im zweiten Schritt bindet (Seruminkubationszeit 45 min) (Abb. 2.1).

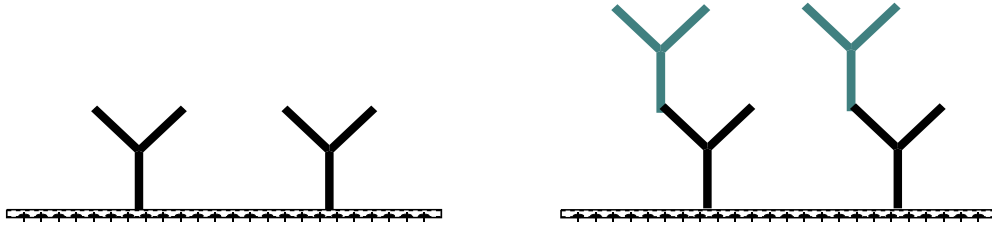


Abbildung 2.1: ELISA-Schritte: 1. Beschichtung mit  $\alpha$ -Kaninchen-IgG und 2. Seruminkubation.

Im Wettbewerbsschritt wird die Probe und nachfolgend ein Enzym-markierter Analyt, auch Tracer genannt, aufgetragen. Das bedeutet, dass im entscheidenden Wettbewerbsschritt der freie Analyt aus der Probe mit dem HRP-Konjugat um die begrenzte Zahl der selektiven Bindungsstellen der immobilisierten Antikörper konkurriert (Abb. 2.2). Das gebundene HRP-Konjugat dient schließlich der Detektion. Es wurde durch kovalente Kopplung des entsprechenden Haptens an HPR analog zur Synthese des Immunogens hergestellt.

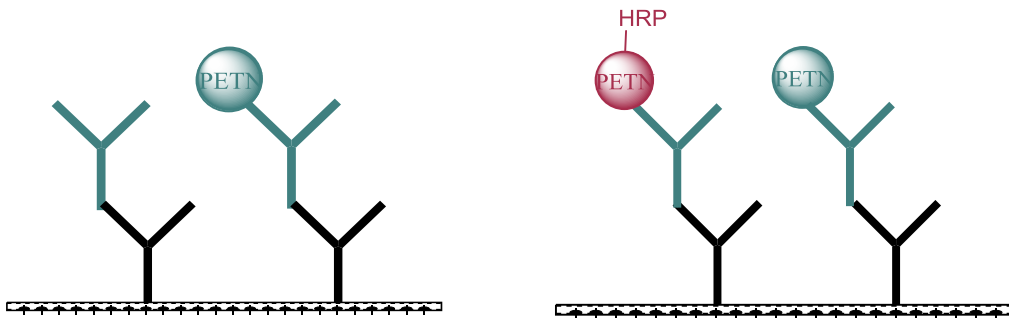


Abbildung 2.2: ELISA-Schritte: 3. Analytauftrag und 4. Konkurrenz durch Zugabe des Tracers.

Die letzten Schritte sind die Entwicklung des Assays und die photometrische Endpunktbestimmung des gebildeten gelben Farbstoffs nach Absenkung des pH-Wertes (Abb. 2.3).

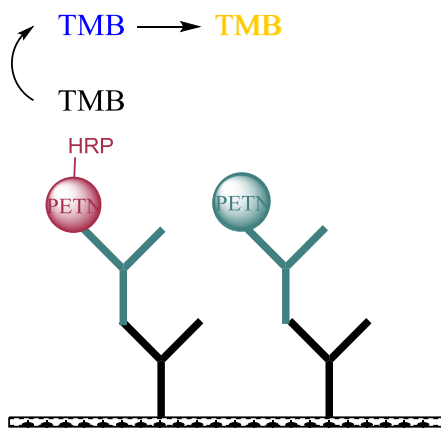


Abbildung 2.3: ELISA-Schritt 5: Farbentwicklung und Stoppen dieser Reaktion mit Schwefelsäure.

Hierdurch wird sowohl die Enzymreaktion gestoppt als auch der zunächst entstandene blaue Farbkomplex protoniert, der in Anwesenheit von HRP und Wasserstoffperoxid aus TMB entstanden ist (Abb. 2.4) [110].

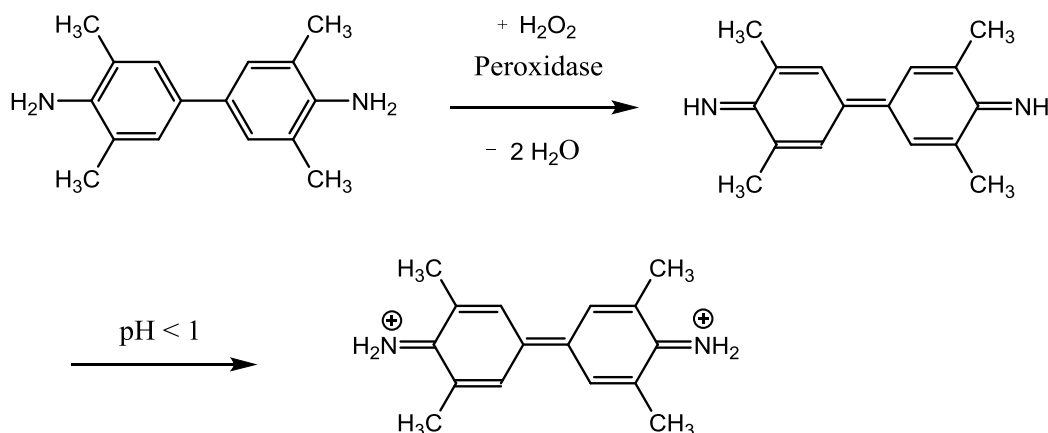


Abbildung 2.4: Farbreaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und  $H_2O_2$  in Gegenwart von HRP.

Die Signalstärke ist invers zu den Analytkonzentrationen, d.h. hohe Extinktionen entsprechen niedrigen Analytkonzentrationen, geringere Extinktionswerte hohen Konzentrationen des Analyten. Die Auswertung erfolgt über eine 4-Parametergleichung [111], die einen sigmoidalen Kurvenverlauf beschreibt [112].

$$Extinktion = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{C_{PETN}}{C}\right)^B} + D$$

Sie ist vergleichbar mit den Dosis-Wirkungs-Kurven aus der Pharmakologie [113], weswegen die Konzentration im Wendepunkt der Kurve (Parameter C in 4-Parametergleichung), auch als mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) angegeben werden kann. Dieser Testmittelpunkt kann direkt zur Abschätzung der Affinität der Antikörper sowie zur Bestimmung der Kreuzreaktivität herangezogen werden [114-116].

### 2.1.2 Präzisionsprofil

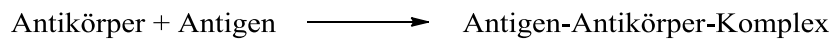
Die Werte der 4-Parametergleichung werden zur Bestimmung des Messbereichs durch die Erstellung eines Präzisionsprofils nach *Ekins* [117] herangezogen. Durch den sigmoidalen Kurvenverlauf weisen die Werte mit den höchsten Steigungen (um den Testmittelpunkt herum) die höchste Genauigkeit auf. Die Messunsicherheit nimmt zu höherer und niedrigerer Konzentration hin drastisch zu. Der relative Fehler berechnet sich als:

$$rel. Fehler [\%] = -100 \cdot \frac{\sigma_{Extinktion}}{B \cdot (D - A)} \cdot \left[ \left( \frac{C}{C_{PETN}} \right)^B + 2 + \left( \frac{C_{PETN}}{C} \right)^B \right]$$

Die Konzentration des Analyten wird sowohl gegen die Absorption als auch gegen den relativen Fehler aufgetragen. Die Kurve des relativen Fehlers führt in der Regel zu einem asymmetrischen U-förmigen Profil, das die Bestimmung der Nachweisgrenze und der unteren und oberen Grenze des Messbereichs ermöglicht.

### 2.1.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Affinitätskonstanten werden aus den Minima der  $IC_{50}$ -Werte des kompetitiven ELISAs [114] bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion



ist gegeben mit:

$$K_A = \frac{c_{\text{Antigen-Antikörper-Komplex}}}{c_{\text{Antigen}} \cdot c_{\text{Antikörper}}}$$

Am Testmittelpunkt sind die Konzentrationen von Antikörper und Antigen-Antikörper-Komplex gleich groß. Die Konzentration des Antigens setzt sich aus der Konzentration des Analyten und des Tracers zusammen. Um eine Abschätzung der Konzentration des Analyten zu erhalten, wird die Konzentration des Tracers so weit minimiert, dass gerade noch ein Signal auswertbar ist. Mit der Näherung, die Tracerkonzentration unter diesen Bedingungen gleich Null zu setzen, entspricht die Konzentration des Antigens der des Analyten:

$$K_A = \frac{1}{[c_{\text{Antigen}}]_{50}} = \frac{1}{[c_{\text{Analyt}}]_{50}}$$

Die Analytlösung wird beim kompetitiven ELISA mit der Tracer-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Affinitätskonstante mit dem zusätzlichen Faktor 2 berücksichtigt werden:

$$K_A = 2 \cdot \frac{M_{\text{Analyt}}}{IC_{50}}$$

Der  $IC_{50}$ -Wert wird molar angegeben ( $M_{\text{Analyt}}$ : Molmasse des Analyten).

### 2.1.4 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten (KR)

Die Kreuzreaktivitäten (KR) werden mittels ELISA mit Verdünnungsreihen des Analyten und den zu untersuchenden Substanzen (Kreuzreaktanden) ermittelt. Die unterschiedlichen Testmittelpunkte  $IC_{50}$  der entsprechenden Substanzen werden mithilfe der 4-Parameter-Gleichung ermittelt. Aus diesen lassen sich die Kreuzreaktivitäten anhand folgender Formel berechnen [116]:

$$KR[\%] = \frac{[c_{\text{Analyt}}]_{50}}{[c_{\text{Testsubstanz}}]_{50}} \cdot 100$$

Um bei Substanzen, die nur eine schwache Kreuzreaktivität aufweisen, einen sigmoidalen Verlauf zu erzwingen, wird der Parameter D der Testsubstanz-Kurve mit dem Parameter D der entsprechenden Analyt-Kurve auf der gleichen Mikrotiterplatte gleichgesetzt.

## 2.2 Affinitätschromatographie

### 2.2.1 Prinzip

Affinitätschromatographie ist eine effiziente Methode zur selektiven Anreicherung z. B. von Biomolekülen [118-122]. Sie basiert in der Regel auf der reversiblen und selektiven Wechselwirkung eines auf einer stationären Phase immobilisierten Liganden und eines Analyten in der mobilen Phase. Die Trennung erfolgt auf Basis der individuellen chemischen Struktur des Analyten. Der immobilisierte spezifische hochaffine Ligand, bindet nicht kovalent, meist „biospezifisch“ an dem Zielmolekül, sodass das Molekül selektiv aus einer komplexen Mischung adsorbiert wird. Die Elution kann u. a. mit kompetitiven Liganden oder durch pH-Wert-Wechsel erfolgen und wird häufig als Stufenelution durchgeführt. Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist in Abbildung 2.5 verdeutlicht, Abbildung 2.6 zeigt ein typisches Chromatogramm.

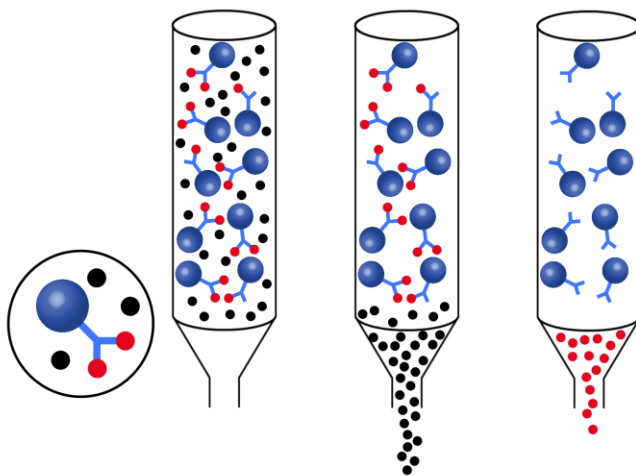


Abbildung 2.5: Prinzip der Affinitätsreinigung von links nach rechts: immobilisierter Antikörper mit bindenden Analyten (rot) und nicht-bindenden Stoffen (schwarz), Laden der Säule mit der Probe, Waschen, d. h. Entfernen der nicht-bindenden Stoffe mit Waschpuffer, Elution des Analyten mit Elutionspuffer.

Die Affinitätschromatographie kann zum Anreichern von Substanzen, die nur in geringer Konzentration vorliegen, oder zum Entfernen von Kontaminationen verwendet werden. Daneben wird sie auch zur Untersuchung biologischer Wechselwirkungen und zur Präparation von Proben für die Massenspektrometrie eingesetzt. Sie ist als einstufiger Prozess im Vergleich zu anderen Aufreinigungstechniken oft sehr effektiv und zeitsparend [123]. Mögliche Bindungspaare können Enzym und Inhibitor, Antikörper und Antigen, Hormon und Rezeptor oder Oligonukleotide und ihre komplementären Stränge sein. Die Affinität des Liganden muss sich nicht auf die selektive Bindung eines einzelnen Moleküls beschränken, sondern kann sich im Fall gruppenselektiver Liganden auch auf eine gesamte Stoffklasse beziehen. Gruppenselektive Liganden sind Lectine für Glycoproteine, Calmodulin für  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, Heparin für Koagulationsproteine, Farbstoffe für Enzyme, Nukleinsäuren für Dehydrogenasen bzw. Kinasen, Protein A und Protein G für IgG. Von den Lectinen bindet immobilisiertes Concanavalin A,  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-glucosehaltige Kohlenhydratregionen, während Agglutinin N-Acetyl-D-Glucosamin adsorbiert. „Monospezifische“ Liganden sind z. B. Antikörper für Antigene, Hormone für deren Rezeptoren, Enzyminhibitoren für Enzyme sowie MBP-Antikörper (MBP für Maltose-bindendes Protein) und GST-Antikörper (GST für Glutathion-S-Transferase) für rekombinante (Fusions-)Proteine.

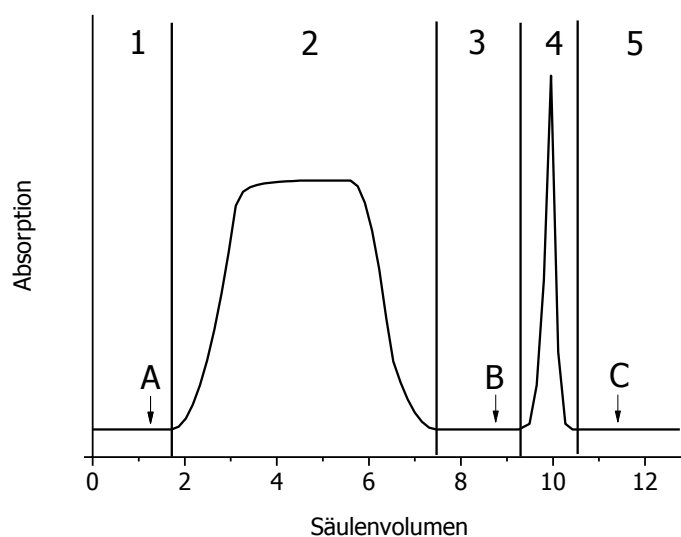


Abbildung 2.6: Typisches Chromatogramm einer Affinitätschromatographie:

A Probenauflage, B Elutionspuffer, C Regenerierungspuffer, 1 Äquilibration, 2 Adsorption der Probe und Elution der ungebundenen Stoffe, 3 Basislinientrennung 4 Elution des Analyten 5 Äquilibration.

Aus Organismen gewonnene biologische Liganden können mit anderen Biomolekülen kontaminiert sein und die Reproduzierbarkeit ist beim Wechsel der einzelnen Chargen nicht unbedingt gegeben. Aus diesem Grund besteht Interesse an der Entwicklung biomimetischer Liganden. Molecular Imprinting, bei dem eine für den Analyten passende Polymerschablone mit komplementären Wechselwirkungsbedingungen für eine hohe Affinität erstellt wird, wurde als alternative Variante vielfach beschrieben [124].

Die Bindung zwischen Ligand und Analyt kann auf elektrostatischen, hydrophoben, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen. Die Gleichgewichtsdissociationskonstante  $K_D$  sollte im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8 \text{ M}^{-1}$  liegen [123]. Sie muss für die selektive Bindung des Analyten stark genug sein und sich im Elutionsschritt zur Isolierung des Analyten wieder lösen lassen. Die Elution kann durch Zugabe eines zum Analyten kompetitiven Reagenzes spezifisch erfolgen. Oft wird sie jedoch unspezifisch durch Änderung der Ionenstärke, z. B. über die Molarität von Natriumchlorid oder durch Änderung des pH-Werts bzw. der Polarität des Elutionspuffers induziert [125]. In seltenen Fällen wird zwischen Ligand und Analyt eine kovalente Bindung wie z. B. eine Disulfidbrücke geknüpft, die im Elutionsschritt gespalten wird [123].

Die Aufreinigung von IgG aus Seren ist von industrieller Bedeutung. Hierzu wird das bereits 1972 von *Hjelm und Kronvall* entwickelte Chromatographieverfahren eingesetzt, das eine besondere Eigenschaft von Protein A nutzt. Hierbei handelt es sich um ein bakterielles Protein aus *Staphylococcus aureus*, das spezifisch am konstanten  $F_C$ -Teil (crystallizable Fragment) der IgG-Antikörper bindet [126-129]. Das Verfahren ermöglicht es, die IgG-Fraktion von den restlichen Proteinen des Serums zu isolieren. Die Affinität von Protein A zu Immunglobulinen der Klasse G ist dabei sowohl vom Organismus, aus dem die Antikörper isoliert wurden, als auch von ihrer Subklasse abhängig [122, 123].



### 2.2.2 Immobilisierungsreaktionen

Liganden, meist Proteine, werden überwiegend kovalent an Trägermaterialien gebunden. Die Anbindung der Proteine erfolgt in der Regel über die Aminogruppe des im Protein enthaltenen Lysins. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Kopplungsreaktionen aufgeführt.

#### Epoxy-Methode

Eine einfache Methode zur Immobilisierung ist die Epoxy-Methode, bei der das Amin die Epoxidgruppe direkt nukleophil angreift (Abb. 2.7) [130].

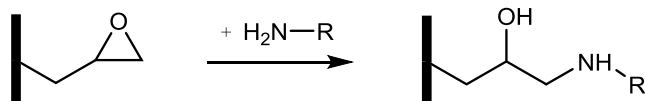


Abbildung 2.7: Reaktionsschema Epoxy-Methode.

Die Kopplung wird im basischen Milieu durchgeführt, damit das Amin nicht in seiner unreaktiven protonierten Form vorliegt. Auf diese Weise können auch andere Nukleophile wie Thiole oder Hydroxylgruppen kovalent binden. Die Reaktionskinetik ist jedoch langsam, sodass hohe Ligandenkonzentrationen und lange Reaktionszeiten notwendig sind [118].

#### Formyl-Kopplung

Bei Trägermaterialien, deren funktionelle Gruppen Aldehydgruppen sind, bilden diese mit den Aminogruppen des Proteins im ersten Schritt eine Schiff'sche-Base (Abb. 2.8). Diese Reaktion ist reversibel, weshalb das gebildete Imin mit Cyanoborhydrid zu einem sekundären Amin reduziert wird (reduktive Aminierung).

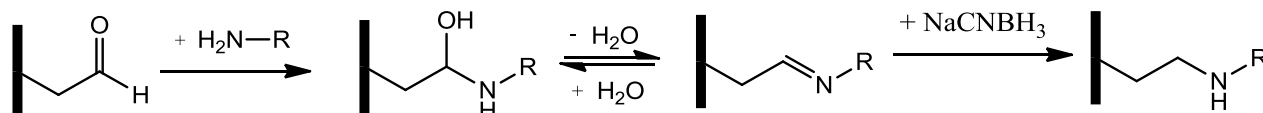


Abbildung 2.8: Reaktionsschema Formyl-Kopplung.

Kritisch bei dieser Methode ist der Einsatz der Reduktionsmittel. Diese sollten im Idealfall das Protein nicht denaturieren bzw. modifizieren. In der Realität ist jedoch eine partielle Denaturierung wahrscheinlich. Die Kinetik dieser Kopplung ist schneller als die der Epoxy-Methode [130].

#### Glutaraldehyd-Methode

Zur Immobilisierung von Proteinen an Amino-Trägermaterialien wird die Aminogruppe mittels Glutaraldehyd durch eine Aldehydgruppe als funktionelle Gruppe ersetzt. Glutaraldehyd wird über eine Formyl-Kopplung kovalent an die Aminogruppe des Trägermaterials gebunden, sodass eine zusätzliche Spacer-Verlängerung erfolgt (Abb. 2.9) [131].

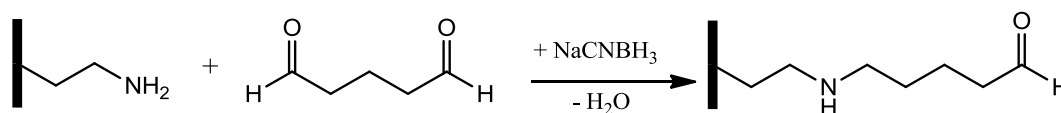


Abbildung 2.9: Reaktionsschema Glutaraldehyd erster Schritt.

Die anschließende Proteinbindung an das mit Aldehydgruppen aktivierte Material erfolgt über eine erneute Formyl-Kopplung via Schiff'sche Base (Abb. 2.10).

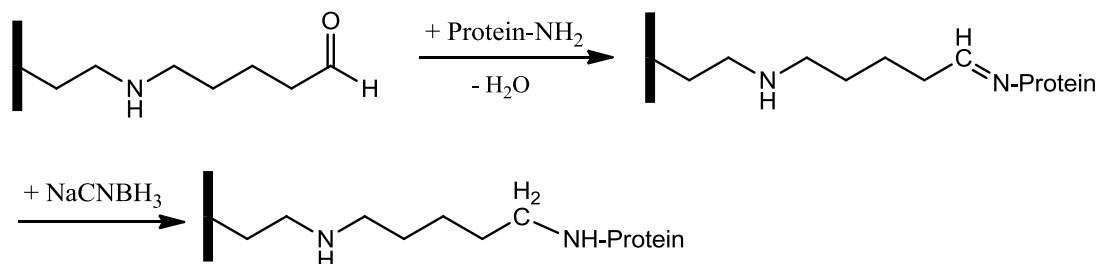


Abbildung 2.10: Reaktionsschema des zweiten Schritts der Glutaraldehyd-Methode, Immobilisierung des Proteins via Schiff'sche Base und deren Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid.

Bei der Verwendung von Glutaraldehyd in wässriger Lösung kann sich allerdings eine Vielzahl von Nebenprodukten bilden, z. B. cyclische bzw. polymere cyclische Hemiacetale (Abb. 2.11) oder  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Polymeren, die zu cyclischen Verbindungen weiterreagieren können (Abb. 2.12) [132].

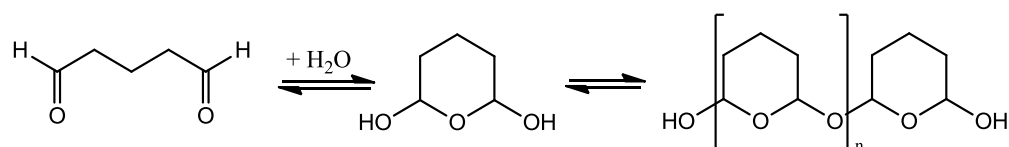


Abbildung 2.11: Reaktion von Glutaraldehyd zum cyclischen bzw. polymeren cyclischen Hemiacetal.

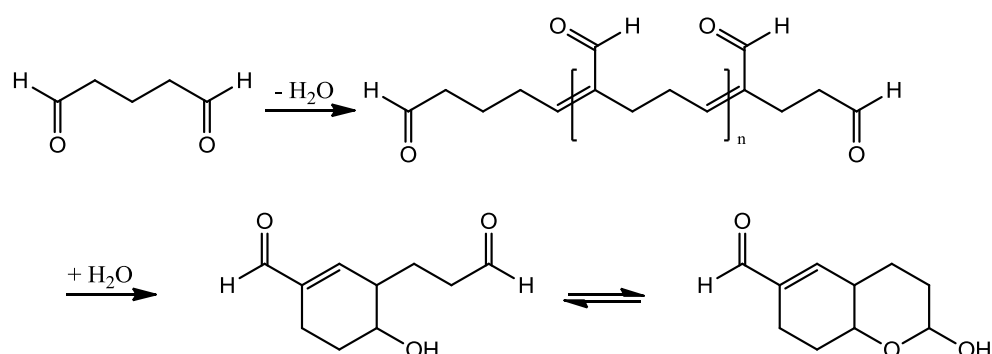


Abbildung 2.12: Reaktion von Glutaraldehyd zu  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Polymeren und mögliche Weiterreaktion zum cyclischen Acetal.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist – aufgrund der Formyl-Kopplung – dass das Protein durch den Einsatz des Reduktionsmittels partiell reduziert wird. Somit liegt der nicht gekoppelte Proteinanteil für spätere Immunisierungen chemisch verändert vor und entspricht nicht mehr exakt dem ursprünglichen Edukt.

### Reaktion mit Anhydrid und anschließender NHS-Aktivierung und Protein-Kopplung

Kleine cyclische Dicarbonsäureanhydride, Bernsteinsäure- oder Glutarsäureanhydrid werden häufig zur Spacer-Verlängerung durch Reaktion an aminofunktionalisierten Trägermaterialien benutzt [133, 134]. Gleichzeitig wird die funktionelle Gruppe in eine Carboxylgruppe umgewandelt, die anschließend z. B. mit NHS aktiviert wird, um das Protein zu binden (Abb. 2.13).

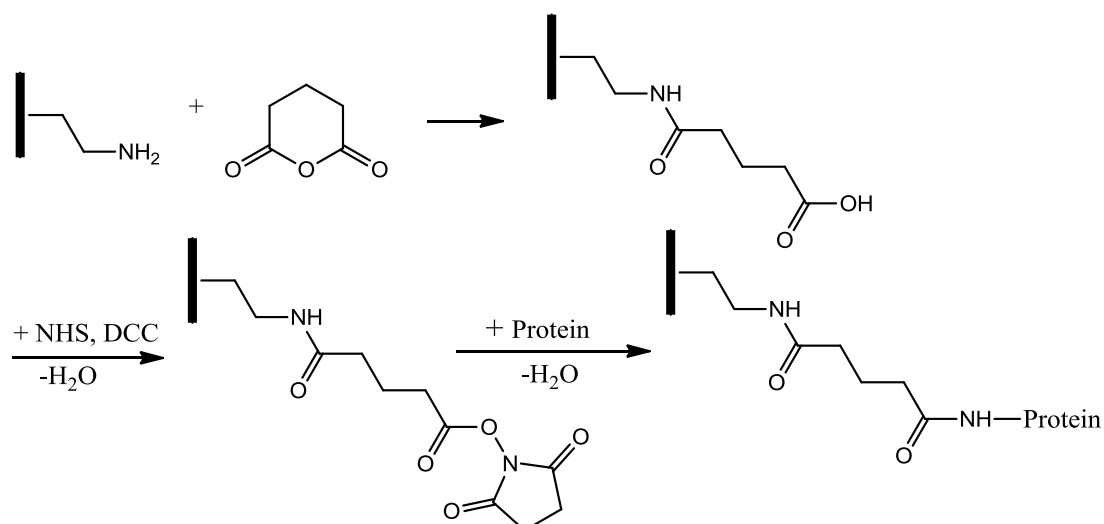


Abbildung 2.13: Reaktionsschema zur Umwandlung der Aminogruppen in Carboxylgruppen mit anschließender NHS-Aktivierung und Protein-Kopplung.

### NHS-Kopplung

Eine sehr verbreitete Kopplungsmethode ist die Verwendung von NHS-Estern, sogenannte aktivierte Carbonsäuren oder Aktiv-Estern. Sie reagieren bereits bei Raumtemperatur mit Aminogruppen unter Bildung einer Amidbindung (Abb. 2.14) [65].

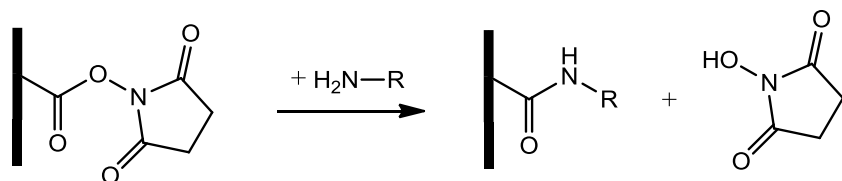


Abbildung 2.14: Reaktionsschema der NHS-Kopplung.

### Tresyl-Kopplung

Nilson und Mosbach nutzen organische Sulfonylchloride, wie Tosylchloride und Tresylchloride, um Agarose und andere hydrophile Trägermaterialien zu aktivieren [135-137]. Sulfonate sind gute Abgangsgruppen und bilden bei Reaktionen mit Nukleophilen, wie Amino- oder Thiolgruppen, stabile kovalente Alkylamine bzw. Thioether. In dieser Arbeit wurde ein mit Tresylgruppen aktiviertes Trägermaterial verwendet (Abb. 2.15).

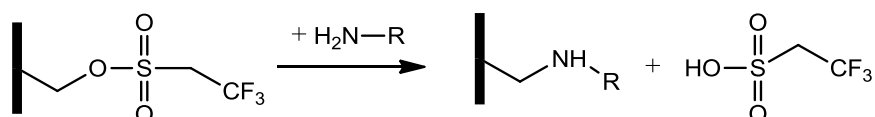


Abbildung 2.15: Reaktionsschema der Tresyl-Kopplung.

## Silanisierung

Um ein poröses Glas zu funktionalisieren, wird die Oberfläche üblicherweise silanisiert. Bei diesem Vorgang findet nach anfänglicher Hydrolyse des Silanisierungsreagenzes eine Kondensation zwischen den Silanolgruppen des Reagenzes und den Silanolgruppen auf der Glasoberfläche statt. Da in dieser Arbeit das poröse Glas mit Epoxygruppen funktionalisiert werden sollte, wurde Glycidoxypropyltrimethoxysilan als Reagenz verwendet (Abb. 2.16) [138]. Um die Silanisierungsschicht bei der anschließenden Epoxykopplung nicht abzulösen und auch die teilweise Auflösung des Glases durch Aufbrechen der Si-O-Si-Bindungen zu vermeiden, wird die Kopplung bei einem nur leicht basischen pH-Wert (pH 8,3 statt 9,5) durchgeführt.

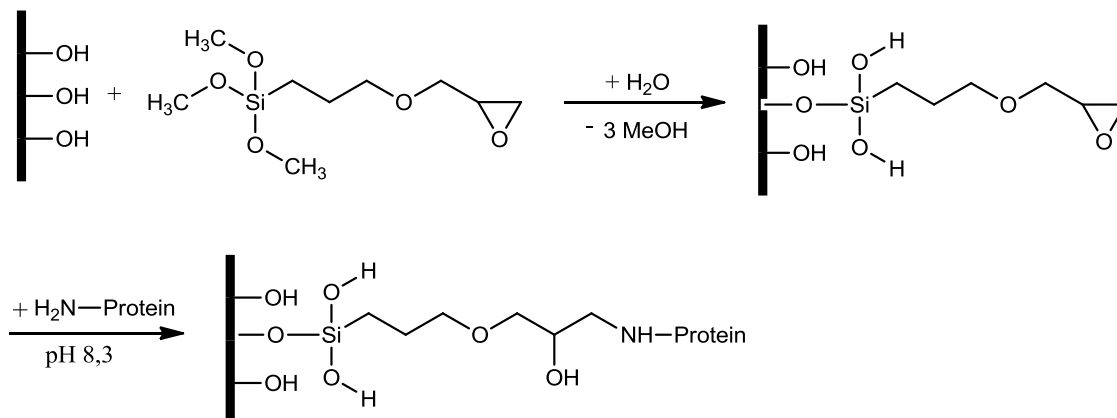


Abbildung 2.16: Silanisierung von Glas mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan.

### 3 Trägermaterialien

Nach einer kurzen Einführung über die geschichtliche Entwicklung der Trägermaterialien werden die Eigenschaften verschiedener Materialien vorgestellt. Anschließend werden die beiden Methoden Gasadsorption und Quecksilber-Intrusionsporosimetrie erläutert, die in dieser Arbeit zur Bestimmung von Porengrößen verwendet wurden.

#### 3.1 Allgemeiner Überblick

*Starckenstein* beschrieb 1910 die erste Kopplung an ein Trägermaterial, indem er Amylase als Ligand an Stärke immobilisierte [139]. Erst durch die Optimierung der Trägermaterialien sowie der Kopplungstechniken konnte sich die Affinitätschromatographie etablieren [140-143]. So muss ein geeignetes Material mechanisch robust, aufgrund funktioneller Gruppen für eine Kopplung funktionalisierbar, ansonsten jedoch chemisch inert sein, um gegenüber Lösungsmitteln, pH-Wert-Schwankungen und gegebenenfalls Enzymen oder Mikroben stabil zu sein [123]. Die Oberfläche sollte hydrophil und ungeladen sein, um hydrophobe und ionische, unspezifische Bindungen zu vermeiden. Damit die Analyten die Liganden ungehindert erreichen können, sollte die Porengröße nach *Renkin* [144] mindestens fünfmal so groß wie das zu isolierende Molekül sein. Die aus Partikeln bestehende Phase sollte eine monodisperse Größenverteilung aufweisen, da anderenfalls durch das Ausfüllen der Zwischenräume mit kleineren Partikeln der Durchfluss behindert wird [123, 125]. In der Regel generieren kleinere Partikel zwar eine größere spezifische Oberfläche, jedoch kann die Säule durch diese blockiert werden. Als Folge des hohen Gegendrucks ist eine Kompression der Partikel möglich. So ist mit der Wahl der Partikelgröße stets ein Abwägen zwischen einer hohen Kapazität und einer guten Permeabilität der Säule verbunden. Um weiche, gelartige Materialien mechanisch zu stabilisieren, werden diese vernetzt, was meist zu Lasten der Porosität und Kapazität geschieht [123]. Zu hohe Kapazitäten können durch sterische Hinderungen und/oder durch zu starke Bindungen des Liganden eine verringerte effektive Kapazität verursachen [145].

Um sterischen Hinderungen der Bindung des Analyten an den Liganden entgegenzuwirken, wird der Ligand meist über einen speziellen Abstandshalter, den Spacer, an die Matrix gebunden [125]. Der Spacer sollte hydrophil sein, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und eine optimale Länge besitzen. Bei einer zu kurzen Länge ist er wirkungslos, da der Analyt teilweise in der Proteinstruktur untergeht. Ist er zu lang entsteht keine ausreichend rigide Struktur. Es können unspezifische Bindungen auftreten oder es wird die Kapazität durch Faltung sogar reduziert [123, 125]. Neben den herkömmlichen, unterivatisierten Trägermaterialien werden auch aktivierte angeboten. Diese sind bereits mit funktionellen Gruppen modifiziert, sodass gezielt und unkompliziert Liganden kovalent gebunden werden können. In der Regel sind zwischen der Matrix und den Kopplungsgruppen bereits Spacer eingefügt (Abb. 3.1).

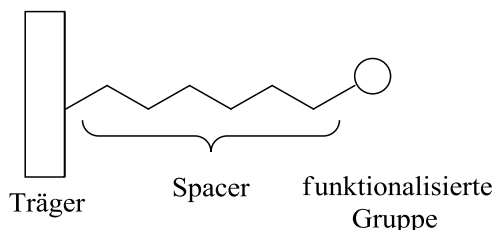


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines aktivierten Trägermaterials.

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Materialien waren funktionalisierte Trägermaterialien. Als Basis für die Matrizen wurden synthetische Methacrylatderivat-Polymere, vernetzte Naturstoffe wie Agarose und Cellulose und poröse Gläser verwendet.

## 3.2 Diverse Trägermaterialien

### 3.2.1 Methacrylatderivate

Kopolymerisation von Glycidylmethacrylat, Pentaerythritdimethacrylat und Polyethylenglykol ergibt eine komplexe Struktur, die reich an Hydroxylgruppen und Etherbindungen ist. Abbildung 3.2 zeigt das schematische Produkt einer solchen Polymerisation. Die Oberfläche, die durch diese Art von einem Polymernetzwerk gebildet wird, ist nur leicht hydrophil und kann unter bestimmten Bedingungen sogar hydrophobe Tendenzen zeigen. Die innere Matrix besteht aus stark verwobenen Polymeragglomeraten, die ihr eine erhebliche mechanische Stabilität verleiht.

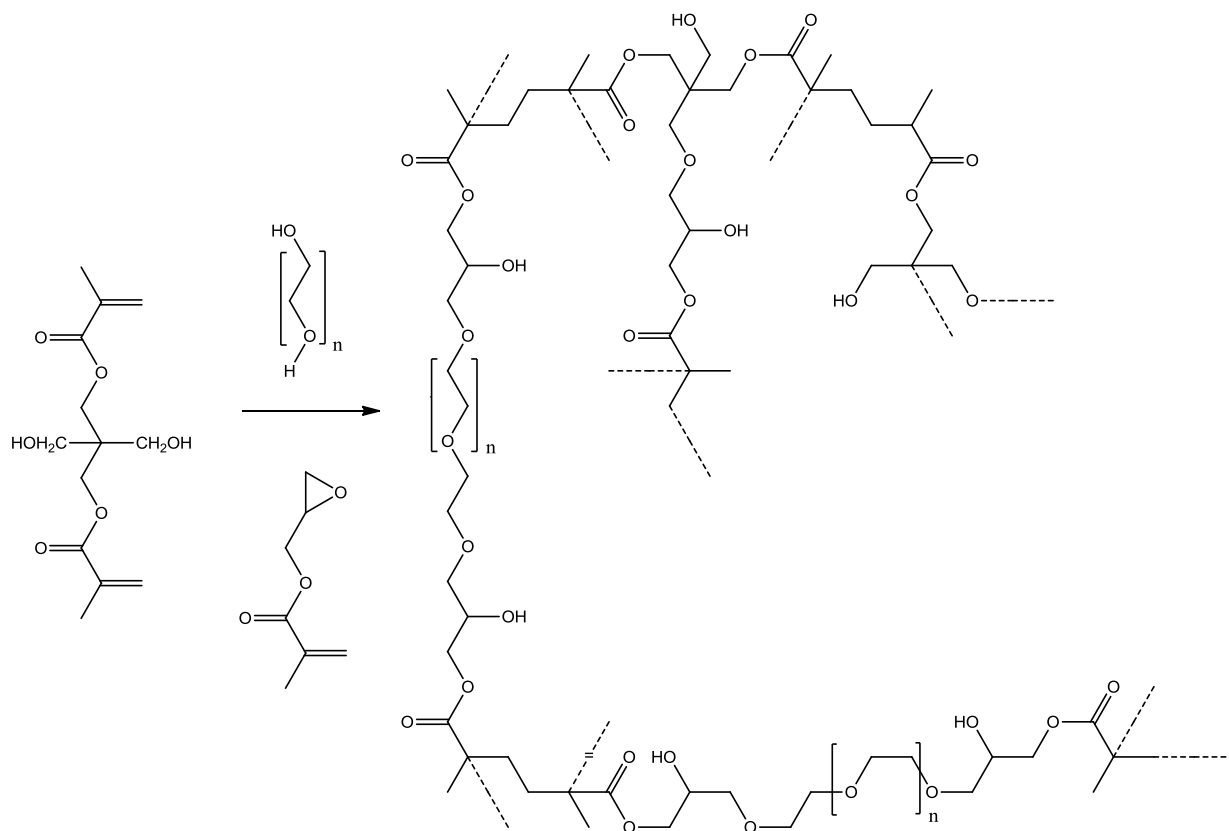


Abbildung 3.2: Polymerisation und Vernetzung von Pentaerythritoldimethacrylat mit Glycidylmethacrylat und Polyethylenglykol.

Toyopearl<sup>®</sup>-Harze sind für den Einsatz in der biopharmazeutischen Produktion entwickelt worden. Aufgrund der starren Polymerstruktur aus Methacrylaten, sind sie mechanisch stabil und zeichnen sich durch gute hydrodynamische Eigenschaften aus. Diese ermöglichen einen hohen Prozessdurchsatz. Optimierte Porendurchmesser und eine enge Partikelgrößenverteilung begünstigen eine schnelle Kinetik und außergewöhnliche Auflösung. Toyopearl<sup>®</sup>-Beads können für Anwendungen mit Drücken bis zu 7 bar verwendet werden und sind in einem Bereich von etwa pH 2-12 stabil. Sie sind mit unterschiedlichen Funktionalisierungen erhältlich. In dieser Arbeit wurde die Formylvariante verwendet [146].

Als weiteres Methacrylat-Trägermaterial wurde Fractogel® EMD-Epoxy verwendet. Bei diesem Säulenmaterial sind die funktionellen Gruppen an langen, linearen Polymerketten gebunden, die sogenannten Tentakeltechnologie. Alle Polymerketten sind kovalent an Hydroxylgruppen der Fractogel®-Matrix gebunden. Diese Konfiguration generiert eine große Oberfläche für Biomoleküle und lässt Bindungen ohne sterische Hinderung zu. So soll eine effiziente Trennung und eine hohe Bindungskapazität auch bei hohen Durchflussraten erreicht werden. Dieses Material ist für Drücke bis zu 20 bar ausgelegt und es stehen eine Vielzahl von Liganden für verschiedene Chromatographie-Anwendungen zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde Fractogel® EMD-Epoxy verwendet [147].

### 3.2.2 Sepharose™

Unter dem Namen Sepharose™ wird quervernetzte Agarose verkauft. Der Name steht für **S**eparation-**P**harmacia-Agarose. Agarose ist ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die glycosidisch miteinander verbunden sind. Der Stoff wird hauptsächlich aus den Rotalgen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen (Abb. 3.3).

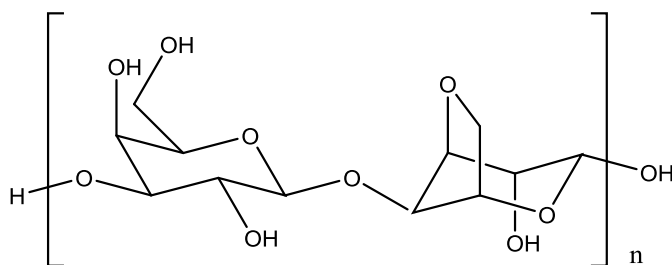


Abbildung 3.3: Strukturformel von Agarose.

Sepharose™ wird häufig als stationäre Phase für die chromatographische Trennung von Biomolekülen eingesetzt. Mit Protein A bzw. Protein G gekoppelte Sepharose™-Kügelchen (englisch *beads*) werden häufig bei der Immunpräzipitation eingesetzt. NHS-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow besteht aus Kügelchen (45-165 µm) aus 4% quervernetzter Agarose. Das Material ist zwischen pH 3 und 13 stabil und mit NHS-Gruppen zum Ankoppeln aminogruppenhaltiger Proteine und Peptide aktiviert.

### 3.2.3 Cellulose

Cellulose als Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden (Massenanteil etwa 50%) ist die in der Natur verbreitetste organische Verbindung und somit auch das mengenmäßig bedeutendste Polysaccharid. Sie besteht aus mehreren hundert bis zehntausend unverzweigten β-D-Glucose-Molekülen (β-1,4-glykosidische Bindung) bzw. Cellobiose-Einheiten (Abb. 3.4).

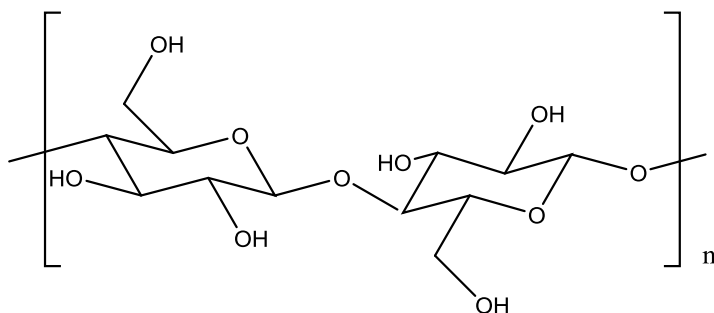


Abbildung 3.4: Strukturformel von Cellulose.

Diese lagern sich zu höheren Strukturen zusammen, sodass ein stabiles Cellulosegerüst entsteht, das in Gestalt von reißfesten Fasern den Pflanzen Stabilität verleiht. Es zeichnet sich ferner durch sehr geringe unspezifische Adsorption aus. Gerade die unspezifische Bindung gilt es bei der Affinitätschromatographie zu unterbinden, sodass dieses Material in funktionalisierter Form für die Affinitätschromatographie verwendet wird.

Formyl-Cellufine™ basiert auf starren sphärischen, für die Affinitätschromatographie optimierten Celluloseperlen (125-210 µm) mit sehr großen Porengrößen, wodurch hohe Durchflussraten möglich werden (Abb. 3.5). Der Arbeitsdruck sollte nicht mehr als 1 bar betragen, sodass eine HPLC-Anwendung nicht realisierbar wäre [148]. Als funktionelle Gruppe fungieren Formylgruppen, sodass eine Ligandenkopplung unter milden Bedingungen in kurzer Reaktionszeit stattfinden kann.

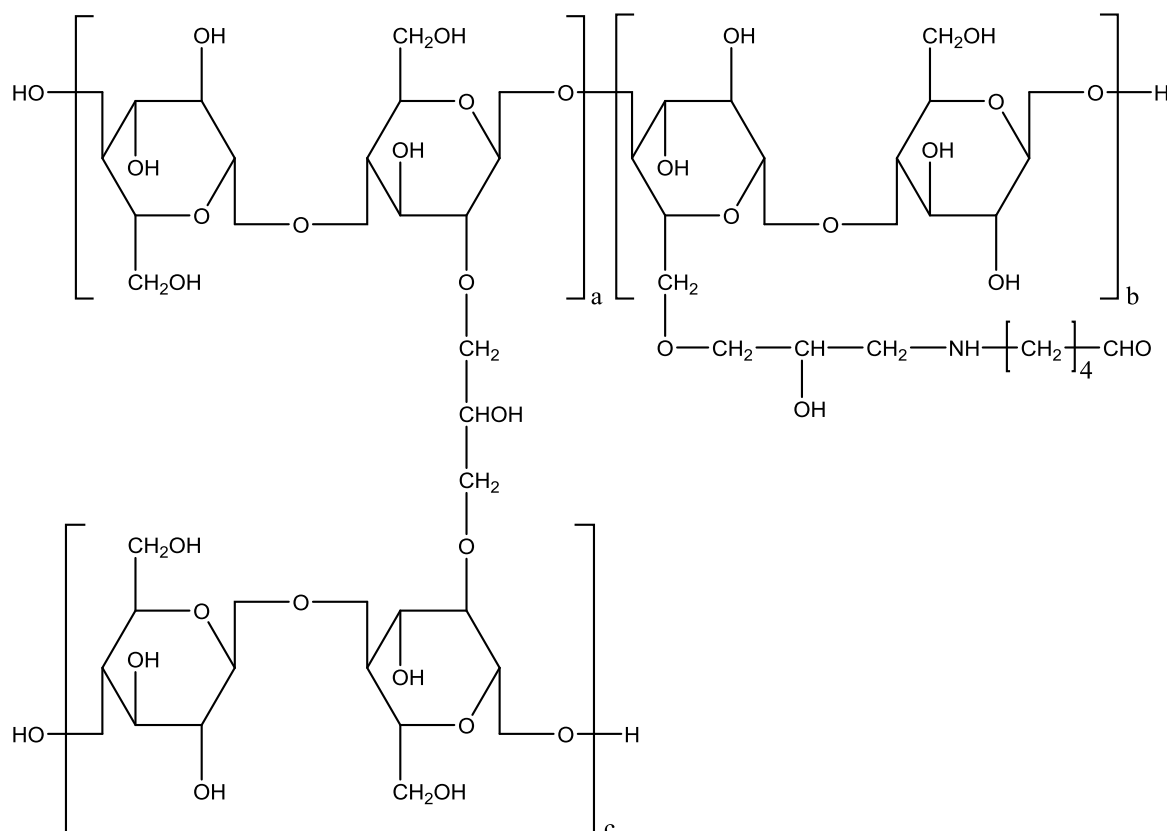


Abbildung 3.5: Strukturformel von Formyl-Cellufine™.

### 3.2.4 Poröse Gläser

Poröse Gläser gehören zu den silikathaltigen (SiO<sub>2</sub>-Gehalt > 95%) Materialien und weisen eine dreidimensionale, verzweigte Mikrostruktur auf [149]. Die Herstellung erfolgt über die Auslaugung phasengetrennter Alkaliborosilikatgläser oder über Sol-Gel-Prozesse. Bei Anwendung des ersten Verfahrens wird das Phänomen der Phasentrennung von Gläsern ausgenutzt, das bei Alkaliborosilikatgläsern besonders ausgeprägt ist. Ausgangspunkt ist das ternäre Glassystem Na<sub>2</sub>O-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>. Abbildung 3.6 zeigt das Phasendiagramm der daraus resultierenden drei binären Teilsysteme Na<sub>2</sub>O-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>.



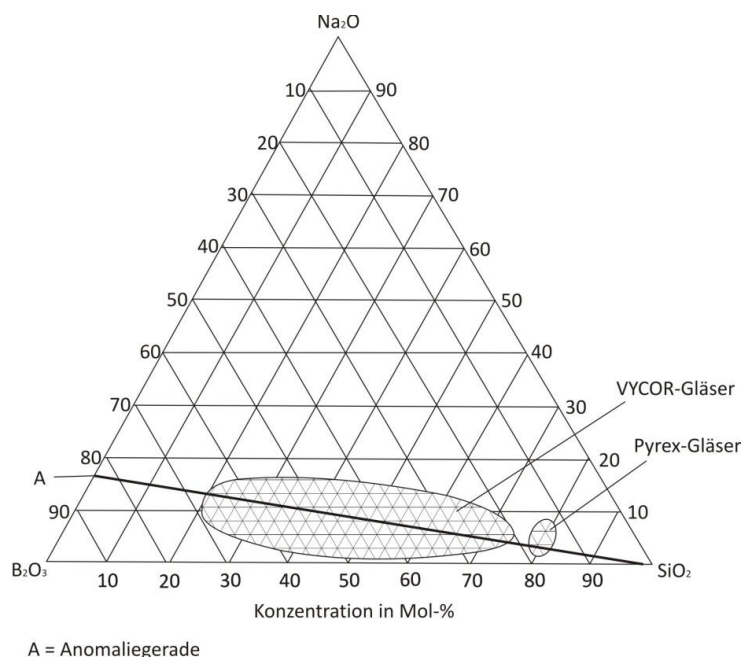


Abbildung 3.6: Ternäres Glassystem  $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$  mit Entmischungsbereich sowie Lage der Gläser vom VYCOR- und Pyrex-Typ [150, 151] (CC BY-SA 3.0 (Riod79 erstellt 24.06.2008)).

Eine Phasentrennung ist nur in dem definierten Bereich der Zusammensetzungen von Alkaliborosilikatgläsern möglich, welcher durch die Anomaliegerade A (Abb. 3.6) gekennzeichnet ist. Besonders in einem Temperaturbereich von 500-580°C tritt eine starke Phasenseparation auf. Dabei bildet sich eine alkalireiche Boratphase sowie eine unlösliche, fast ausschließlich aus  $\text{SiO}_2$  bestehende Phase, welche beide eine zusammenhängende Durchdringungsstruktur bilden. Der Mechanismus der Phasenseparation wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben, wobei zwei Phänomene diskutiert werden. Zum einen wird von einem Keimbildungs- und Keimwachstums-Mechanismus ausgegangen. Zum anderen soll spinodale Entmischung in der Glasmatrix für die Separation der Phasen verantwortlich sein [152, 153].

Die lösliche Alkaliboratphase kann mittels Extraktionsmitteln, wie heißen Mineralsäuren, Wasser oder Alkoholen entfernt werden, wobei die zweite reine  $\text{SiO}_2$ -Phase nahezu unverändert bleibt. Die Hohlraumstruktur des zurückbleibenden  $\text{SiO}_2$ -Skeletts steht damit im direkten Zusammenhang mit der Struktur der Entmischungsbereiche. Die Textur und Struktur der porösen Gläser wird durch die Zusammensetzung des Ausgangsglases, der thermischen Behandlung zur Entmischung und durch das Extraktionsmittel bestimmt [154]. Poröse Gläser können mit maßgeschneiderten Poren in einem breiten Porenbereich (0,3-1000 nm) hergestellt werden. So kann der Bereich der Mikro- (< 2 nm), Meso- (2-50 nm) und Makroporen (> 50 nm) abgedeckt werden und eine breite Modellierung des porösen Systems erfolgen [155]. Im Unterschied zu anderen porösen Feststoffen können durch den Herstellungsprozess eine sehr enge Porengrößenverteilung sowie eine große innere Oberfläche und hohe Porenvolumina erzeugt werden [156]. Drei verschiedene  $\text{SiO}_2$ -Strukturen (Netzwerk- $\text{SiO}_2$ , feindisperses  $\text{SiO}_2$  und kristallines  $\text{SiO}_2$ ) bestimmen dabei die Struktur- bzw. Textureigenschaften. Auf den Oberflächen der porösen Gläser finden sich OH-Gruppen in unterschiedlicher Konzentration je nach dem Tempervorgang im Herstellungsprozess. Die durch schwach saure Silanol- und restliche Boranolgruppen hervorgerufene Acidität der porösen Gläser ist nur gering und kann durch den Präparationsprozess, den Borgehalt und die Bedingungen der thermischen Aktivierung kontrolliert werden. Weiterhin kann das Material sehr flexibel in verschiedene geometrische Formen (z. B. Perlen, Stäbchen, Fasern, ultradünne Membranen) gebracht werden. Die porösen Gläser „VYCOR-Glas“ und „Controlled Pore Glass“ (CPG) werden schon seit einigen Jahren kommerziell vertrieben [157].

Für die Anwendung in der Affinitätschromatographie ist dieses druckstabile Material besonders für den Einsatz in der HPLC geeignet. Aufgrund der bei der Herstellung flexibel konfigurierbaren Porengröße, steht für jede Anwendung ein Material mit optimaler Porengröße zur Verfügung, so dass hohe Säulenkapazitäten erreicht werden können. Es ist aber zugleich zu beachten, dass die Porengröße auch die Diffusionsprozesse bestimmt und die gewünschte schnelle Kinetik nicht verlangsamen soll. Auch sinkt die Kapazität des Affinitätsmaterials trotz höherer spezifischer Oberfläche, wenn die Porendurchmesser für eine Immobilisierung von großen Biomolekülen zu klein sind.

### 3.3 Methoden zur Bestimmung der Porengrößen

Für Porosimetrieuntersuchungen im trockenen Zustand sind Gasadsorption und Quecksilber-Intrusionsporosimetrie die Methoden der Wahl [158].

#### 3.3.1 Gasadsorption

Mit Hilfe der Gasadsorption [159] können spezifische Oberflächen und Mikro- bzw. Mesoporengrößenverteilungen poröser Stoffe bestimmt werden. Hierzu wird ein Inertgas, das Adsorptiv, auf der Oberfläche eines Feststoffs, dem Adsorbens physisorbiert [160]. Die Physisorption beruht auf der Wirkung von Van-der-Waals-Kräften zwischen Adsorbat und Adsorbens. Es ist auch eine weitere Adsorption an der bestehenden Adsorbatschicht möglich ist, sodass mehrere Adsorptionsschichten ausgebildet werden können. Auf ein Adsorptiv wirken stets zwei einander entgegengesetzte Kräfte, die vom Abstand zur Oberfläche abhängig sind: Eine abstoßende Kraft, die proportional zu  $r^{-12}$  ist, und eine anziehende, proportional zu  $r^{-6}$ . Diese Beziehung, die die potentielle Energie des Teilchens beschreibt, ist als *Lennard-Jones-Potential* bekannt [161]. Typische Werte der Physisorption liegen bei etwa 20 kJ/mol. Zwischen den freien und den adsorbierten Teilchen bildet sich ein dynamisches Gleichgewicht aus. Für eine gegebene Temperatur besteht eine Beziehung zwischen der Zahl der pro Flächeneinheit adsorbierten Teilchen und dem Druck des Adsorptivs in der Gasphase. Als Adsorptiv wird üblicherweise Stickstoff (Flächenbedarf  $a_m = 0,162 \text{ nm}^2$ ) [162] bei seinem Siedepunkt von 77 K eingesetzt. Die Graphik in Abbildung 3.7 verdeutlicht den typischen Zusammenhang zwischen der adsorbierten Menge („Beladung“) und dem Druck für ein mikro- bzw.- makroporöses System. Die dargestellte Kurve (Abb. 3.7) wird Adsorptionsisotherme genannt.

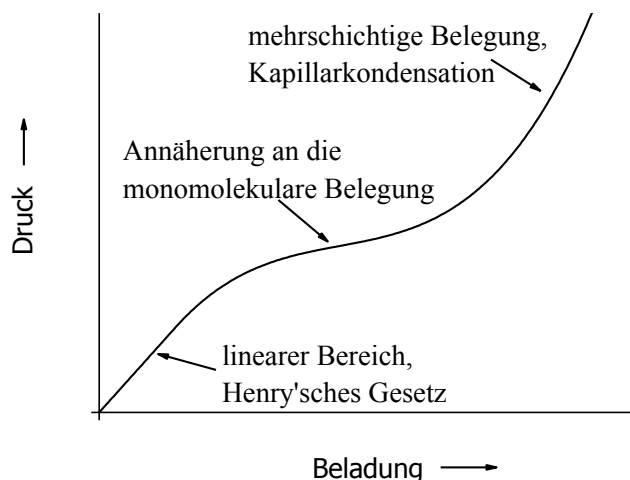


Abbildung 3.7: Typische Isotherme einer Porenanalyse mittels Stickstoffadsorption.

Bei kleinem Druck ist zunächst ein linearer Anstieg der Adsorptionsisothermen zu beobachten, der durch die Ausbildung eines Monolayers nach dem Henry'schen Gesetz zu erklären ist.

$$p = K_H x$$

$p$ : Druck des Gases,  $K_H$ : Henry-Konstante,  $x$ : Stoffmengenanteil des Gases

Bei steigendem Druck strebt die Beladung zunächst gegen einen Grenzwert, der von *Langmuir* als monomolekulare Belegung der Oberfläche gedeutet wurde. Mit steigendem Druck wird der Anstieg der Beladung immer steiler. Dies ist zunächst auf einen Bereich mehrschichtiger Belegung zurückzuführen, der von *Brunauer, Emmett und Teller* beschrieben wurde [160]. Darauf folgt schließlich die Kapillarkondensation und somit die endgültige Füllung der Poren mit dem Adsorptiv. Die drei genannten Bereiche gehen fließend ineinander über und lassen sich nicht exakt abgrenzen.

Unter Verwendung von Stickstoff werden Porengrößen im Bereich von 0,4-300 nm erfasst. Für die Messung wird die entgaste Probe einem Gasstrom ausgesetzt und das adsorbierte Gasvolumen (Adsorbat genannt) volumetrisch oder gravimetrisch ermittelt [159]. Nach anschließender Verringerung des Drucks setzt die Desorption des Gases ein, sodass die Messmethode zerstörungsfrei arbeitet. Der Adsorptionsisotherme lassen sich alle Parameter entnehmen, die für eine Bestimmung der Oberfläche nach Brunauer-Emmett-Teller (BET) erforderlich sind. Die Adsorptionsisothermengleichung (BET-Gleichung) lautet in linearisierter Form [160]:

$$\frac{p}{n_a(p_0 - p)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{(C - 1)}{n_m C} \cdot \frac{p}{p_0}$$

$p_0$ : Sättigungsdampfdruck des Adsorptivs,  $n_a$ : adsorbierte Stickstoffmenge beim relativen Druck  $\frac{p}{p_0}$ ,  $n_m$ : Monolayerkapazität,  $C$ : Konstante, abhängig von der Isothermenform

*Gregg und Sing* zeigten, dass dieser Zusammenhang für den Bereich  $0,05 < p/p_0 < 0,30$  linear ist [163], sodass durch Auftragen von  $\frac{p}{p_0}$  gegen  $\frac{p}{n_a(p_0 - p)}$  die Konstante  $C$  und  $n_m$  bestimmt werden kann [164]. Die BET-Oberfläche kann somit folgendermaßen berechnet werden:

$$A_{BET} = n_m \cdot N_A \cdot a_m$$

$a_m \approx 0,162 \text{ nm}^2$ : BET Stickstoffmonolayer mit dichtester Packung bei 77 K,  $N_A$ : Avogadro-Konstante

Die Porengrößenverteilung für Poren größer als 2 nm wird nach der Kelvin-Methode durch Verwendung der Daten der Adsorptionskurve mit der Kapillarkondensations-Gleichung berechnet [164, 165]:

$$r_p = \frac{2V_m \sigma \cos \vartheta}{RT \ln \frac{p}{p_0}} \approx \frac{-0,953 \text{ nm}}{\ln \frac{p}{p_0}}$$

$r_p$ : Porenradius  $p_0$ : gesättigter Druck bei 77 K,  $p$ : Gleichgewichtsdruck der Stickstoffadsorption,  $\sigma$ : Oberflächenspannung,  $\vartheta$ : Kontaktwinkel,  $V_m$ : molares Gasvolumen,  $T$ : Temperatur,  $R$ : universelle Gaskonstante

Der eigentliche Porenradius  $r_p$  ergibt sich [166] aus der Summe des Kelvinradius  $r_K$  und der Schichtdicke  $t$  des Adsorbats [164]:

$$r_p = r_K + t$$

Für die Bestimmung der Schichtdicke des Adsorbats  $t$  gibt es einige Modelle. Am häufigsten wird das Modell nach *de Boer* verwendet [160, 167].

$$t = 0,1 \text{ nm} \cdot \sqrt{\frac{13,99}{0,034 - 0,4343 \cdot \ln \frac{p}{p_x}}}$$

$t$ : Schichtdicke des Adsorbats

### 3.3.2 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie

Die Quecksilber-Intrusionsporosimetrie wurde von *Ritter und Drake* entwickelt [168, 169]. Mit dieser Methode können die Porengrößenverteilung, das Gesamtporenvolumen, die spezifische Oberfläche einer porösen Probe sowie die Dichte und die Porosität des Materials bestimmt werden. Quecksilber als nichtbenetzende Flüssigkeit wird durch Druckerhöhung in die Poren gepresst. Je kleiner die Pore, desto höher der aufzuwendende Druck. *Washburn* [170, 171] beschrieb 1921, dass der Kontaktwinkel einer Flüssigkeit größer als  $90^\circ$  sein muss, damit ihre Oberflächenspannung einer Intrusion in Poren ohne äußere Druckeinwirkung entgegenwirkt. Die *Washburn*-Gleichung transformiert den angelegten Druck  $p$  in den entsprechenden Porenradius  $r_p$ . Der Druck verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Porenradius:

$$r_p = - \frac{2\sigma \cos\vartheta}{p}$$

$r_p$ : Porenradius,  $p$ : Druck,  $\sigma$ : Oberflächenspannung des Quecksilbers,  $\vartheta$ : Kontaktwinkel (Benetzungswinkel) [159, 164, 172]

Quecksilber erfüllt mit einem vom Feststoff abhängigen, aber in der Regel mit ca.  $140^\circ$  angenommenen Kontaktwinkel diese Bedingung. Die Oberflächenspannung beträgt bei  $25^\circ\text{C}$   $0,484 \text{ Nm}$  [159, 173]. Viele Verbindungen weisen mit  $< 90^\circ$  einen zu kleinen Kontaktwinkel auf und sind somit für die Messung nicht ausreichend hydrophob [173]. Quecksilber ist somit die für dieses Verfahren einzige universell geeignete nicht benetzende Flüssigkeit [172]. Bei diesem Verfahren wird die trockene und nicht amalgambildende Probe in einem Penetrometer evakuiert, um Luft aus den Poren zu entfernen. Anschließend wird die Kammer mit Quecksilber befüllt, der Druck sukzessive erhöht und das abnehmende Quecksilbervolumen als Funktion des Drucks registriert. Aus der aufgenommenen Quecksilber-Intrusionskurve wird durch Transformation des Drucks in den Porenradius nach *Washburn* die kumulative Porenvolumenverteilung erstellt und durch ihre einfache Ableitung die differentielle Porenvolumenverteilung erhalten [159]. Die Messung des Drucks erfolgt bis  $400 \text{ MPa}$ , sodass Porenweiten im Bereich von ca.  $4 \text{ nm}$  bis  $400 \mu\text{m}$  erfasst werden können [174]. Es müssen aber mögliche Kompressionen der Probe und des Quecksilbers sowie thermische Einflüsse berücksichtigt werden [174]. Bei Reduktion des Drucks zieht sich das Quecksilber weitgehend aus den Poren wieder zurück und die erhaltene Hystereseform lässt gewisse Rückschlüsse auf die tatsächlich vorliegende Porenform zu [172, 173, 175]. Da die Extrusion des Quecksilbers nicht vollständig erfolgt, handelt es sich bei der Quecksilber-Intrusionsporosimetrie um keine zerstörungsfreie Methode.

Der Berechnung der spezifischen Oberfläche  $S_m$  nach *Rootare und Prenzlow* [176] liegt abgesehen von wenigen allgemeinen Bedingungen an die Porenform kein spezielles Porenmodell zu Grunde. Die Gleichung leitet sich aus der Arbeit  $dW$  her, die für das Eintauchen einer Fläche  $dS$  eines nicht benetzten Pulvers in Quecksilber zu leisten ist:

$$dW = \sigma \cdot \cos\vartheta \cdot dS$$

$\sigma$ : Oberflächenspannung des Quecksilbers,  $\vartheta$ : Kontaktwinkel

Diese entspricht der Arbeit, die für die Intrusion des Quecksilbervolumens  $dV_q$  in der Probe unter äußerer Druckeinwirkung verrichtet wird:

$$\sigma \cdot \cos\vartheta \cdot dS = -pdV_q$$

Das Integral zur Berechnung der spezifischen Oberfläche  $S_m$  kann entweder numerisch oder aus der Quecksilber-Intrusionskurve graphisch ermittelt werden:

$$S_m = -\frac{1}{m \cdot \sigma \cdot \cos\vartheta} \cdot \int_{q,0}^{q,max} -pdV_q$$

Da bei diesem Verfahren Poren kleiner als 4 nm nicht erfasst werden, können die berechneten Werte von denen abweichen, die mittels Gasadsorption bestimmt werden. Ein linearer Zusammenhang zwischen den mit beiden Methoden ermittelten spezifischen Oberflächen besteht im Bereich von 10 bis 100 m<sup>2</sup>/g [122, 172].



## 4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen kommen in vielen Bereichen, wie der Lebensmittelanalytik oder der klinischen Diagnostik, aber auch zur Prüfung von Enzymaktivitäten zum Tragen. Proteinproben sind häufig eine komplexe Mischung verschiedener Proteine. Zur Quantifizierung des Proteingehalts dieser Rohproteinlösungen werden häufig spektroskopische oder kolorimetrische Reaktionen verwendet. Einige Methoden weisen nur einige spezielle Aminosäuren nach, wie die UV-Bestimmung bei 280 nm. Kolorimetrische Methoden nutzen z. B. den Nachweis der Amidbindung aus. Einen Überblick über die verschiedenen Proteinbestimmungsmethoden gibt Abbildung 4.1.

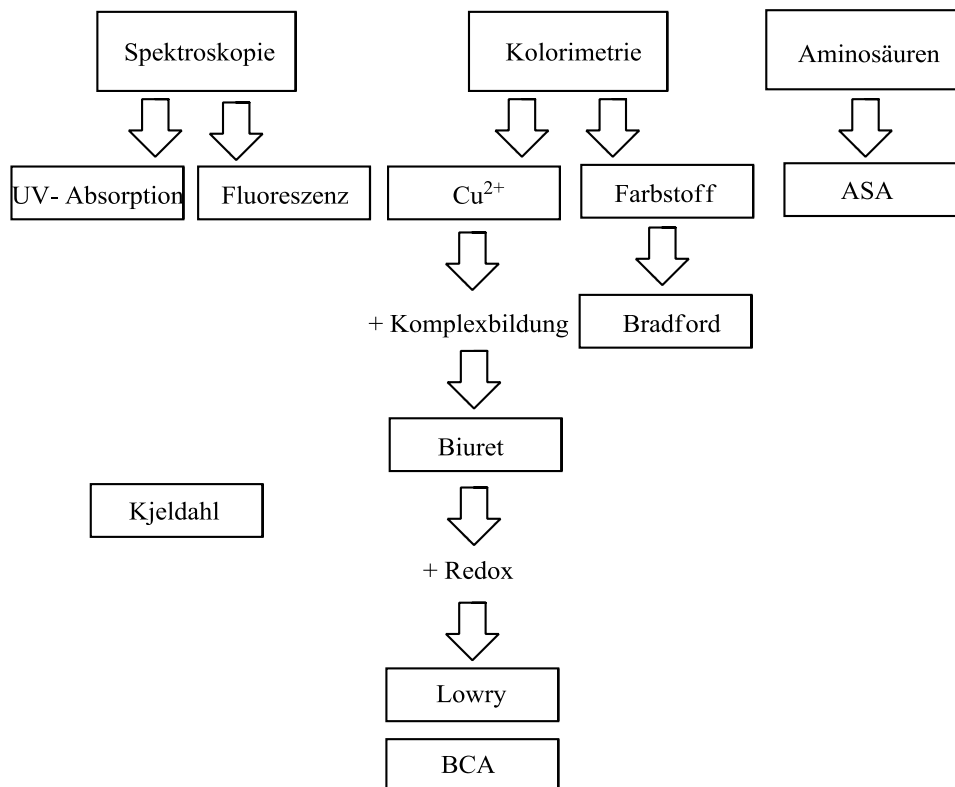
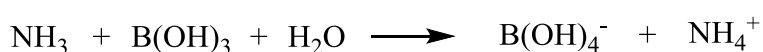


Abbildung 4.1: Überblick einiger Proteinbestimmungsmethoden (ASA: Aminosäureanalyse, BCA: Bicinchoninsäure-Assay).

### 4.1 Klassische Proteinbestimmungsmethoden

#### 4.1.1 Kjeldahl-Methode

Bei einer der ältesten Proteinbestimmungsmethoden aus dem Jahr 1883 nach *Kjeldahl* [177] wird der Proteingehalt durch Reduktion von Stickstoffverbindungen zu Ammoniak bestimmt. Die Proteinprobe wird mit einem Überschuss an Schwefelsäure in einem offenen Kolben erhitzt, wobei der Kohlenstoff im organischen Material zu Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) oxidiert und die Schwefelsäure zu Schwefeldioxid (SO<sub>2</sub>) reduziert wird. Der Amidstickstoff wird mittels Katalysator (Schwermetalle und Selen) in Ammoniumsulfat überführt. Die anschließende Behandlung mit Lauge setzt Ammoniak frei, welches mittels Wasserdampf-Destillation in eine borsäurehaltige Vorlage überführt wird:



Diese Boratlösung wird anschließend mit Salzsäure titriert.



Um den Proteingehalt zu berechnen, wird der durch die Titration ermittelte Stickstoffwert mit 6,25 ( $\cong 100/16$ ) multipliziert, da der Stickstoffgehalt von Proteinen (zwischen 15-18%, durchschnittlich 16%) annähernd konstant ist [177].

#### 4.1.2 280 nm-Methode

*Soret* hatte 1883 die Idee, den Proteingehalt durch UV-Absorption zu bestimmen [178]. Als quantitative Methode hat *Holiday* sie 1936 etabliert [179]. Wegbereitend waren in der Zwischenzeit Arbeiten von *Ward, Smith, Stenstrom und Reinhardt* in den Jahren 1923-1929 [180]. Die Absorption bei 280 nm erfolgt lediglich durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie in deutlich geringerem und meist vernachlässigbarem Maße von Phenylalanin. Da Proteine eine unterschiedliche Anzahl an aromatischen Aminosäuren enthalten, unterscheiden sie sich deutlich hinsichtlich ihrer Extinktionskoeffizienten bei 280 nm. Diese liegen typischerweise zwischen 1 und 2,5  $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Nachweisgrenze dieser Methode wird mit 20-3000  $\mu\text{g/mL}$  angegeben, wobei Detergenzien, DNA und Lipide diese Nachweismethode stören. Im Jahre 1942 verfeinerte *Warburg* diese Methode, indem er eine Korrektur bei Anwesenheit von DNA unter Zuhilfenahme der Wellenlänge 260 nm einführte [180, 181]:

$$c(\text{Protein})\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right] = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

*Kalb* nutzte im Zuge einer weiteren Verfeinerung eine noch kürzere Wellenlänge von nunmehr 230 nm [182]. Zur Proteinbestimmung ergab sich daraus diese Formel:

$$c(\text{Protein})\left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right] = 183 \cdot A_{230} - 75,8 \cdot A_{260}$$

*Scopes* verwendete die Wellenlänge 205 nm zur Proteinbestimmung [183], da diese Methode nicht so stark von der Aminosäurezusammensetzung abhängt. In diesem Bereich absorbieren die C=C-Doppelbindungen und die C=O-Doppelbindungen der Peptidbindungen. Demzufolge stören die Aminosäuren His, Phe, Tyr und Trp, die zusätzliche Doppelbindungen in den Resten aufweisen. *Scopes* berücksichtigte dies mit folgender Korrektur:

$$c(\text{Protein}) = 27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}}$$

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1-100  $\mu\text{g/mL}$ .

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der IgG-Konzentration die vereinfachte lineare Berechnung auf Basis der Absorption von 280 nm eingesetzt. Dabei wurde der Extinktionskoeffizient von IgG mit 1,37  $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet [184].

#### 4.1.3 Biuret-Methode

Bei der kolorimetrischen Biuretmethode nach *Riegler* [185] werden Peptidbindungen nachgewiesen, indem der daraus gebildete Kupfer-Amid-Komplex spektroskopisch gemessen wird (540 nm). Für diese Probe wird kein Biuret verwendet, wie der Name nahelegt, sondern es entsteht bei Anwesenheit von Amidbindungen ein ähnlicher Komplex, den auch Biuret bildet (Abb. 4.2).



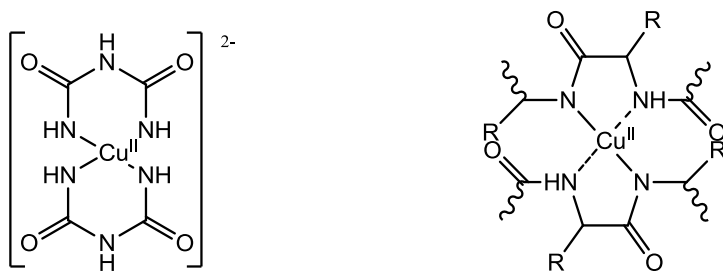


Abbildung 4.2: Kupferkomplexe mit Biuret und mit Amidbindung in alkalischer Lösung.

Um die Stabilität der Kupferionen zu erhöhen, hat *Kingsley* das Verfahren modifiziert [186, 187]. Weitere Optimierungen unter Verwendung von Natrium-Kalium-Tartrat als Komplexbildner wurden durch *Weichselbaum* [188] und *Gornall* [189] etabliert. Die Tyrosinreste tragen ebenfalls zur Farbbildung bei. Gestört wird der Nachweis durch Anwesenheit von Ammoniumsulfat, Glucose, Natriumphosphat, Tris etc. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5-15 mg/mL [190], der lineare Messbereich bei 0,5-4 mg/mL [191]. *Ellman* reduzierte die Detektionsgrenze auf 0,01 mg/mL, indem er die Messung des Komplexes im UV-Bereich bei 263 nm durchführte [192].

#### 4.1.4 Lowry-Methode

1951 wurde der *Lowry*-Assay entwickelt, der lange Zeit das wichtigste Verfahren zur Proteinbestimmung war, sodass diese Veröffentlichung zum meist zitierten Paper wurde. Die Methode nutzt ebenfalls den anfänglich gebildeten Kupferkomplex zur Detektion. Durch eine nachgeschaltete Redoxreaktion mit erneuter Komplexbildung des reduzierten  $\text{Cu}^+$  mit Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdätschwefelsäure und Wolframatophosphorsäure/Heteropolysäuren) wird eine deutlich bessere Nachweisgrenze mit 1-1500  $\mu\text{g/mL}$  erreicht [193]. Der lineare Arbeitsbereich liegt zwischen 20 und 500  $\mu\text{g/mL}$ . Die Detektion ist bei 750 nm, 650 nm und 540 nm möglich [191]. SDS stört nicht. Anders verhält es sich jedoch bei Reagenzien wie EDTA, DTT, Triton X-100, Thiolreagenzien, Ammoniumsulfat,  $\text{Mg}^{2+}$  und Saccharose. Ein weiterer Nachteil ist, dass es zu großen Empfindlichkeitsunterschieden zwischen Proteinen kommt. Durch Optimierung der Methode, durch zusätzliche Tartrateinwirkung, gelang es *Hartree* die Nachweisgrenze auf 0,1  $\mu\text{g/mL}$  zu senken. Der lineare Bereich liegt bei 15-110  $\mu\text{g/mL}$  [194]. 2008 wurde die zeitliche Entwicklung dieses Tests innerhalb von zwei Stunden untersucht, was zu einer verbesserten Linearität führte [195].

#### 4.1.5 Bradford-Methode

Eine Proteinbestimmung, die unspezifische Bindungen zu kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine (hauptsächlich Arg und Lys) im sauren Medium zur Detektion nutzt [196], ist der 1976 von *Bradford* veröffentlichte *Bradford*-Test, der als Reagenz Coomassie Brilliantblau G 250 verwendet (Abb. 4.3) [197].

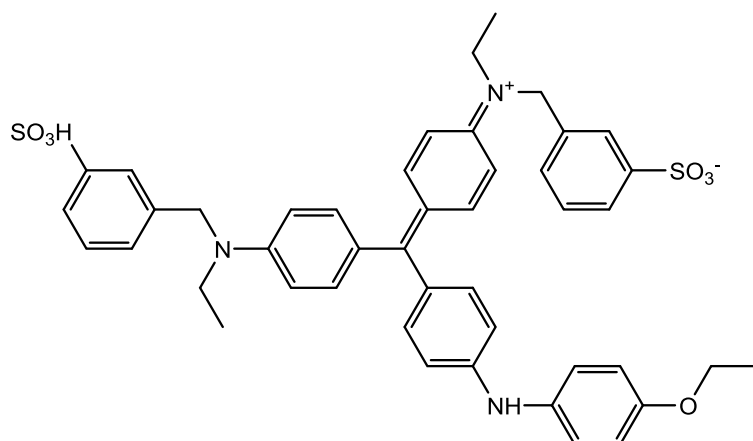


Abbildung 4.3: Bradfordreagenz Coomassie Brilliantblau G 250.

Dieser Test ist sensitiver als der *Lowry*- und der *BCA*-Test. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05-0,5 µg/mL. Störungen werden durch SDS, Triton-X, DOC etc. hervorgerufen. Auch hier treten bei unterschiedlichen Proteinen große Empfindlichkeitsunterschiede auf. Diese Methode wird vor allem zum Anfärben von Proteinbanden in Gelen verwendet.

Da oft recht unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die zuvor beschriebenen Tests angegeben werden, hat *Okutucu* die drei klassischen kolorimetrischen Methoden 2007 verglichen [191]. Die vierte Spalte „Optimierte Nachweisgrenze“ wurde entsprechend den erwähnten Artikeln ergänzt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der kolorimetrischen Proteinbestimmungsmethoden sowie deren Optimierungsmöglichkeiten.

Test	Linearer Bereich [µg/mL]	Nachweisgrenze [µg/mL]	Optimierte Nachweisgrenze
<i>Biuret</i>	500 - 4000	20	ab 10 µg/mL, <i>Ellman</i>
<i>Lowry</i>	20 - 500	15	ab 0,1 µg/mL, <i>Hartree</i>
<i>Bradford</i>	20 - 500	18	-

Literatur: [194, 195, 198]

#### 4.1.6 Bicinchoninsäure-Assay (BCA)

Eine weitere Proteinkonzentrationsbestimmung (Messbereich: 20-2000 µg/mL) [193] ist mit dem 1985 von *Smith et al.* entwickelten *BCA*-Test (Bicinchoninsäure) möglich [199]. Das verwendete Reagenz ist über mehrere Tage stabil, jedoch ist der Einfluss von Zeit und Temperatur so gravierend, dass die Sensitivität der Proteinbestimmung dadurch beeinflusst wird. Auch dieser Test nutzt nach der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  eine Komplexbildung von  $\text{Cu}^+$  (562 nm) (Abb. 4.4).

Bei niedriger Temperatur (RT) reagieren lediglich Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan, bei erhöhter Temperatur (60°C) tragen zusätzlich die Peptidbindungen zur Farbreaktion bei, sodass diese Methode nicht so anfällig auf Variationen der Aminosäurezusammensetzung reagiert [200]. Das Verfahren ist unempfindlich gegen Detergentien wie SDS und Triton-X-100. Unterbefunde werden durch EDTA, Ammoniumsulfat, Natriumphosphat und Glycin, Überbefunde durch Saccharose, Glucose und DTT vorgetäuscht. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1-1 µg/mL, der lineare Messbereich bei 20-500 µg/mL.

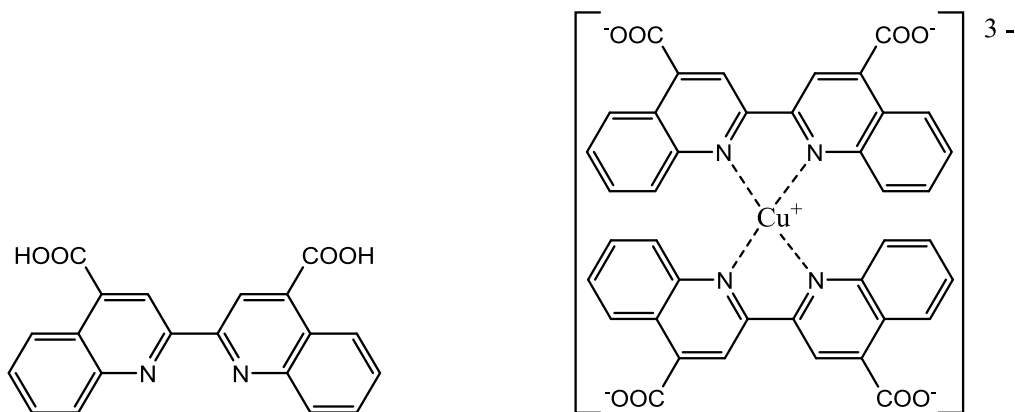


Abbildung 4.4: Strukturformel des BCA-Reagenzes und des violetten  $\text{Cu}^+$ -BCA-Komplexes, Absorption bei 562 nm.

#### 4.1.7 NanoOrange<sup>®</sup>-Assay

Der NanoOrange-Assay ist ein sensibler Fluoreszenztest. Das NanoOrange<sup>®</sup>-Reagenz basiert auf einem Merocyanin-Farbstoff (Abb. 4.5). Jones *et al.* geben einen Messbereich von 10 ng/mL bis 10  $\mu\text{g/mL}$  Protein bei Verwendung eines Standard-Fluorometers an [201].

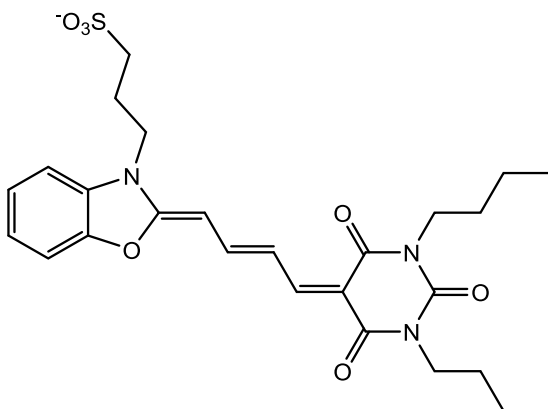


Abbildung 4.5: Strukturformel von Merocyanin-Farbstoff.

## 4.2 Proteinhydrolyse

Die konventionelle Proteinhydrolyse verwendet 6 M Salzsäure als Hydrolysereagenz und wird bei 110°C im Vakuum für 20 bis 24 h meist in Flüssigphase durchgeführt. Häufig werden Radikalfänger wie Phenol verwendet, um Reaktionen mit Trp, Cys, Met, Ser und Thr zu unterbinden. Zur Beschleunigung der Reaktionszeit haben Gehrke *et al.* die Reaktion auch für 4 h bei 145°C durchgeführt [202]. Als Faustformel kann eine Halbierung der Reaktionszeit bei Erhöhung um 10°C verwendet werden. Seltener wird die alkalische Hydrolyse mit 4 N NaOH (18-70 h) zur Bestimmung von Tryptophan verwendet. Die enzymatische Hydrolyse mit Pronase bei pH 7-8 wird durchgeführt, um den Asn bzw. Glu-Gehalt zu bestimmen.

Klassisch wird als Reaktionsgefäß ein Hydrolyseröhrchen verwendet, das evakuiert und mit Stickstoff gespült werden kann. Es wird sehr saubere, sogenannte *subboiled* HCl verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden. Alternativ kann auch eine Gasphasenhydrolyse durchgeführt werden.

Eine Übersicht über die verschiedenen in der Literatur dokumentierten konventionellen Hydrolysemethoden mit 6 M HCl ist in Tabelle 4.2 zu finden, wobei einige Aminosäuren schlecht quantifizierbar sind. Tryptophan mit seiner säureempfindlichen Indoleinheit wird nahezu vollständig zerstört [203, 204].

Tabelle 4.2: Methoden zur konventionellen, sauren Hydrolyse.

Hydrolysemedium	Hydrolysebedingung	Besondere Methode zur Aminosäurebestimmung*	Literatur
6 M HCl	105°C, 20, 36, 70 h	Asx(1), Cys(2), Lys(1), Ser(1), Thr(1)	[148]
6 M HCl	105°C, 20, 70, 140 h	Asx(1), Cys(2), Glx(1), Lys(1), Ser(1), Thr(1)	[149]
6 M HCl	110°C, 22, 70 h	Arg(1), Asx(2), Cys(3), Glx(1), Pro(1), Ser(1), Thr(1), Tyr(1)	[150]
6 M HCl	110°C, 22, 70 h	(4)	[151]
6 M HCl	110°C, 20-140 h	Cys(5), Ser(1), Thr(1)	[152]
6 M HCl	110°C, 24-141 h	Cys(1)(3), Met(1)(3), Ser(1), Thr(1)	[153]

\*alle Aminosäuren außer Trp wurde bestimmt

(1) Extrapolation gegen  $t = 0$ ; (2) Schwefelbestimmung; (3) nach Oxidation mit Perameisensäure als Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure; (4) alle proteinogenen Aminosäuren (Met<sup>(3)</sup>, Cys<sup>(3)</sup>) mittels Hydrolysekinetik mit Ausnahme von Trp; (5) als S-Carboxymethylcystein

Eine Verkürzung der Hydrolysezeit der konventionellen Proteinhydrolyse kann neben einer höheren Hydrolysetemperatur oder eines anderen Hydrolysemediums durch die Verwendung einer Mikrowelle erreicht werden. *Kroll et al.* [205] führten die mikrowelleninduzierte Hydrolyse von Myoglobin (15 mg) in 6 M HCl in der Flüssigphase bei 130°C (2,5-3 bar) durch und reduzierte die Hydrolysezeit auf 120 min. *Joergensen et al.* [206] hydrolysierten Standardproteine (20-50 mg) in 6 M HCl bei 150°C (3-4,5 bar) für 30 min. Die erzielten Ergebnisse sind mit denen der konventionellen Methode vergleichbar [205-208].

Die Proteinhydrolyse ist in der Regel der arbeitsaufwendigste und fehleranfälligste Probenvorbereitungsschritt der Analytik proteingebundener Aminosäuren. Um Probenverlusten zu korrigieren, haben *Walsh und Brown* einen internen Standard (z. B. Norleucin) zur Hydrolyselösung gegeben [209]. *Gardener et al.* [210] zeigten, dass die Verwendung eines Hydrolysestandards die Genauigkeit der Aminosäureanalyse deutlich erhöht. Die Stabilitäten proteinogener Aminosäuren hängen nicht nur von den Hydrolysebedingungen, sondern auch von der Beschaffenheit der Realprobe ab. Daher kann die Wiederfindung der Aminosäuren in der Realprobe von der eines reinen Standardproteins in Wasser variieren, da potentielle chemische Reaktionen wie *Maillard*-Reaktionen, Protein-Phenol-Wechselwirkungen, metallkatalysierte Nebenreaktionen und radikalische Reaktionen möglich sind [204, 206, 211-214].

Die reaktiveren Aminosäuren wie Serin und Threonin, bauen sich im Verlauf der Hydrolyse ab. Mittels einer zeitlichen Korrektur des Abbaus ist eine Konzentrationsbestimmung möglich. Auch ist die Konzentrationsbestimmung von Valin (Val) und Isoleucin (Ile) problematisch. Die stabilen Val-Val- und Ile-Ile-Bindungen werden bei der 24-stündigen Hydrolyse nicht vollständig gespalten, sodass zu niedrige Konzentrationen der freien Aminosäuren Val und Ile ausgewiesen werden. Tryptophan, welches weitgehend und Cystein, welches teilweise zerstört wird, sind ebenfalls schwierig fehlerfrei

zu bestimmen. Auch Methionin (Met) kann partiell oxidieren und die Säureamidfunktionen von Asparagin (Asn) und Glutamin (Gln) werden unter den Bedingungen der konventionellen Proteinhydrolyse vollständig in die entsprechenden Carbonsäuren Asp und Glu umgewandelt. Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht über Methoden der sauren Hydrolyse mit Additiven. Eine Zusammenfassung der unerwünschten Nebenreaktionen sowie möglicher Vorbeugungsmaßnahmen ist in Tabelle 4.4 zusammengestellt [215].

*Tabelle 4.3: Optimierte Bestimmungen hydrolyseanfälliger Aminosäuren bei der sauren Hydrolyse.*

Hydrolysemittel plus Additiv	Hydrolyse- bedingung	Methode spezifisch für Bestimmung von	Literatur
6 M HCl, 1% 2-Mercaptoethanol, 3% Phenol	145°C, 4 h	Trp, Met, Tyr	[216]
6 M HCl, 0,4% 2-Mercaptoethanol	110°C, 24 h	Trp, Met, Tyr	[217]
6 M HCl, 0,02% Phenol	110°C, 24 h	alle außer Cys, Trp	[207, 218, 219]
6 M HCl, 3% Phenol	166°C, 25 min oder 145°C, 4 h	Trp, Tyr, Met	[220]
HCl, 0,4% $\beta$ -Mercaptoethanol	110°C, 24 h	Trp	[217]
7 M HCl, 10% Mercaptoessigsäure, Indol		Trp	[221]
TFA-HCl (1:2), 5% Mercaptoessigsäure	166°C, 25-50 min	Trp, Met	[222]
4 M MSA oder 5,7 M HCl, vorher 10 min Oxidation mit Ameisensäure bei 50°C	150°C, 90 min	alle	[223]
6 M HCl Proben werden vorher mit Ameisensäure oxidiert	145°C, 4 h	Cys, Met, Lys	[224, 225]
4 M MSA, vorher Proben mit Tryptamin alkylisieren	115°C, 22 h	alle	[226]

TFA: Trifluoressigsäure; MSA: Methansulfonsäure

*Tabelle 4.4: Nebenreaktionen der verschiedenen Aminosäuren bei der Hydrolyse.*

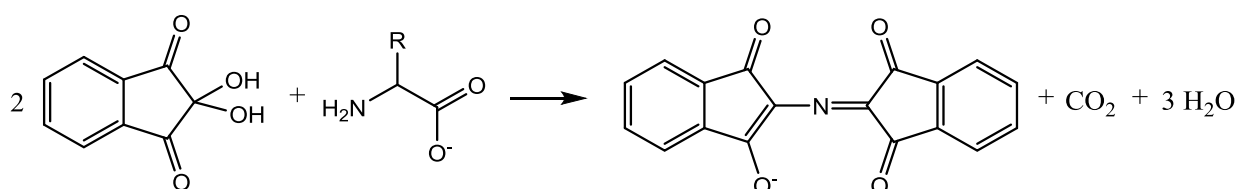
Aminosäure	Effekt	Lösung
Tyr	Halogenierung	0 - 0,1% Phenol
Ser, Tyr	wird langsam zerstört	Zeitreihe: Korrekturfaktor
Val, Ile	unpolare Bindungen werden nur langsam gebrochen	a) Zeitreihe: Korrektur b) 7 M HCl, 10% TFA, 0,1% Phenol
Trp	wird komplett zerstört	a) alkalische Hydrolyse b) 7 M HCl, 10% TFA, 0,1% Thioglycolsäure (TGA), Indol
Met	partielle Oxidation	a) gründliches Spülen mit Stickstoff b) Oxidation mit Perameisensäure c) 7 M HCl, 10% TFA, 0,1% Thioglycolsäure (TGA), Indol
Cys	größtenteils zerstört	a) Oxidation mit Perameisensäure b) Reduktion und Alkylierung vor der Hydrolyse
Asn, Gln	Umwandlung in Asp, Glu	Enzymatische Hydrolyse

### 4.3 Aminosäureanalyse

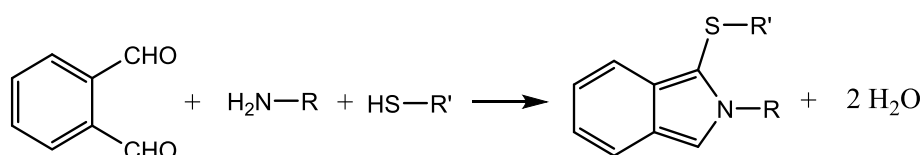
Nach der Proteinhydrolyse erfolgt die Detektion der proteinogenen Aminosäuren. Die erste Aminosäureanalyse wurde 1948 von *Stein und Moore* durchgeführt [227]. Die Aminosäureanalyse gilt zwar als der Goldstandard für die quantitative Peptid- und Protein-Analyse, dennoch wird dieser Ansatz häufig als zu langsam und zu kompliziert angesehen, um als Routineverfahren eingesetzt zu werden.

Bei fast jeder Aminosäuredetektion findet eine Derivatisierung vor oder nach der Säule statt. Die Vorsäulenderivatisierungen nutzt in der Regel eine RP-Säule zur Trennung, die Nachsäulenderivatisierung trennt mittels Ionenchromatographie. Bei der schnelleren Vorsäulenderivatisierungsanalyse (10-45 min), können Fehler durch Reaktion von Ammonium bzw. Puffer mit den Derivatisierungsreagenzien auftreten. Die robustere Nachsäulenderivatisierung dauert dagegen deutlich länger (Analysezeit 1-2 h). Folgende Derivatisierungen haben sich etabliert:

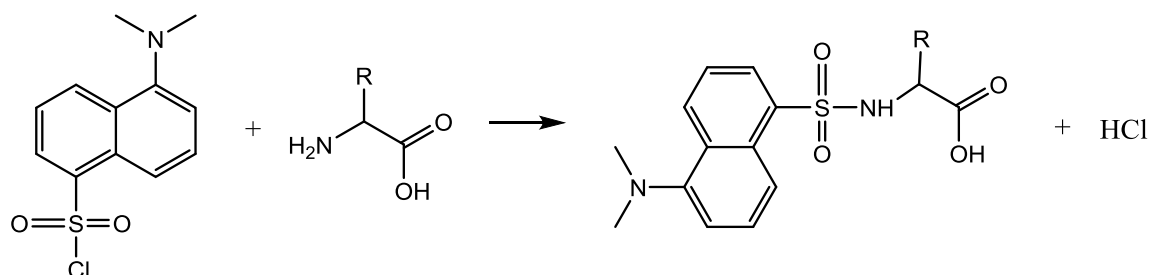
- Ninhydrin [227], Nachsäulenderivatisierung



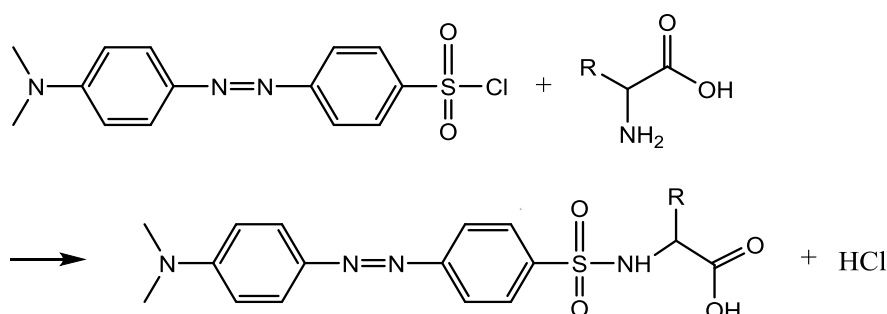
- Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) [228, 229], Vor- und Nachsäulenderivatisierung



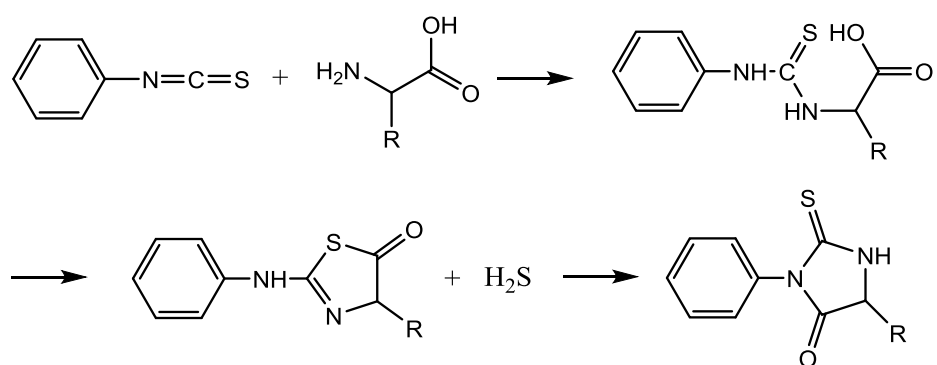
- Dansylierung [230, 231], Vorsäulenderivatisierung



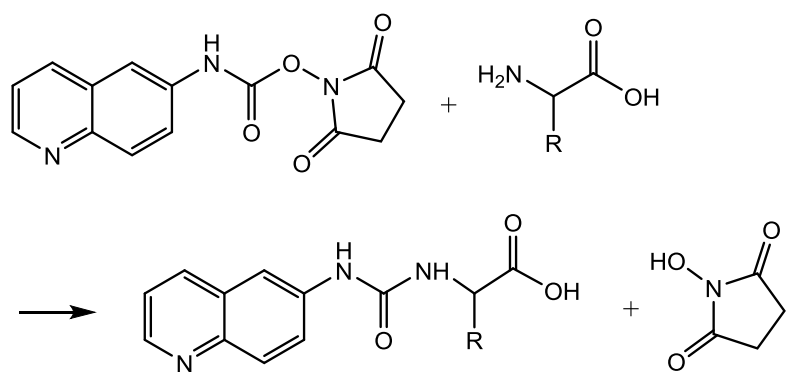
- Dabsylierung [232], Vorsäulenderivatisierung



- Phenylisothiocyanat [233], Vorsäulenderivatisierung



- 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC)-Derivatisierung [234], Vorsäulenderivatisierung







## 5 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Vorschriften der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente aufgeführt. Die Erläuterungen und Auswertungen der Experimente erfolgen in den Kapiteln 6 bis 10. Eine detaillierte Liste der verwendeten Chemikalien, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien, analytischen Instrumente und Geräte befindet sich im Anhang.

### 5.1 Synthese des PETN-Haptens und dessen Konjugate

Bei der Synthese des Haptens wurde das Konzept des bioisosteren Ersatzes angewandt, indem ein Nitroester durch einen Carbonatdiester ersetzt wurde. Für die Immunisierung wurde das Hapten an BSA, zur Entwicklung des Immunoassays an POD gekoppelt. Um die Kopplungsdichten der Proteinkonjugate zu bestimmen, wurden die Massen der Konjugate mittels Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) bestimmt (Auswertung in Kap. 6).

#### 5.1.1 Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN)

Die Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN) wurde nach *Blackburn et al.* durchgeführt [68].

#### 5.1.2 Synthese von Pentaerythritoltrinitratmethyl-6-hydroxyhexylcarbonat

Die Synthese des asymmetrischen Dialkylcarbonats basiert auf einem modifizierten Verfahren nach *Anzini* [235, 236]. Zur Herstellung von Pentaerythritoltrinitrat-methyl-6-hydroxyhexylcarbonat wurde 171 mg ( $\pm 0,63$  mmol) Pentaerythritoltrinitrat in 3 mL trockenem Pyridin gelöst und 198 mg ( $\pm 1,22$  mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) zugegeben. Nach 19 h Rühren bei 55°C wurden 750 mg ( $\pm 6,34$  mmol) 1,6- Hexandiol hinzugegeben und das Gemisch wurde weitere 19 h bei 55°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde der Ansatz mit Ethylacetat (1:100) verdünnt. Zu der organischen Phase wurden 100 mL Wasser und 2,8 mL konz. HCl hinzugefügt. So wurde Pyridin durch Protonierung in die wässrige Phase überführt und aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die organische Schicht wurde über Natriumsulfat filtriert und anschließend im Vakuum getrocknet. Der rohe Rückstand wurde über Flash-Chromatographie mit Silicagel 60, 0,036-0,071 mm (215-400 Mesh) mit Cyclohexan:Ethylacetat = 2:1 gereinigt.

#### 5.1.3 Synthese von Pentaerythritoltrinitratmethyl-5-carboxypentylcarbonat

Die Synthese von PETriN-Carbonyloxyhexansäure (PETriN-CHA) wurde nach *Corey und Schmidt* durchgeführt [237]. Zu einer Lösung von 52 mg ( $\pm 0,125$  mmol) Pentaerythritoltrinitrat-methyl-6-hydroxyhexylcarbonat in 2 mL DMF, welches 2,35  $\mu$ L Wasser enthält, wurden 250 mg ( $\pm 0,664$  mmol) Pyridiumdichromat (PDC) hinzugegeben und der Ansatz wurde 19 h bei RT gerührt. Nach Verdünnung mit Ethylacetat (1:100) und dreimaligem Waschen mit je 100 mL Wasser und anschließendem Einengen wurde die organische Schicht über Natriumsulfat filtriert und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit Flash-Chromatographie mit Chloroform:Methanol = 50:1 gereinigt.

#### 5.1.4 Synthese von NHS-PETriN-Carbonyloxyhexansäureester

Zur Synthese des NHS-PETriN-Carbonyloxyhexansäureesters (PETriN-CHA-NHS) wurde das Hapten PETriN-CHA ( $M = 429,29 \text{ mg/mol}$ ) mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert [65]. Die Reaktion wurde mit einem 1,2-fachem-Überschuss an NHS und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) durchgeführt: 33,7 mg ( $\triangleq 78,5 \text{ }\mu\text{mol}$ ) PETriN-CHA wurden in 200  $\mu\text{L}$  wasserfreiem 1,4-Dioxan (99,8%) unter Argon gelöst. Zusätzlich wurde eine Spatelspitze Di-(N-Succinimidyl)carbonat (DSC) hinzugegeben, um eventuell vorhandene Wasserspuren zu entfernen [7]. Es wurden folgende Lösungen hergestellt: 49,26 mg DCC in 130  $\mu\text{L}$  trockenem 1,4-Dioxan (ca. 1,8 M) und 33,14 mg in 100  $\mu\text{L}$  trockenem 1,4-Dioxan (ca. 2,9 M). 32,5  $\mu\text{L}$  der NHS-Lösung ( $M = 115,09 \text{ g/mol}$ , 10,77 mg  $\triangleq 93,6 \text{ }\mu\text{mol}$ ) und 52,3  $\mu\text{L}$  der DCC-Lösung ( $M = 206,33 \text{ g/mol}$ , 19,82 mg  $\triangleq 96,0 \text{ }\mu\text{mol}$ ) wurden zur Haptenlösung hinzugefügt und 4 h bei RT bei 180 rpm geschüttelt. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren von dem entstandenen Niederschlag abgetrennt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die NHS-PETriN-CHA-Lösung wurde durch präparative Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) mit einer semipräparativen, monolithischen Umkehrphasensäule (Phenomenex® 100 mm x 10 mm, Onyx™ Monolithic-C18: CHO-7878) gereinigt. Die Trennung wurde bei RT mit einem 20-minütigen Gradienten von 30% bis 80% Acetonitril (ACN) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,6 (Lösungsmittel A) und ACN (Lösungsmittel B) verwendet (Methode: Flussgeschwindigkeit: 3,4 mL/min: 0-20 min 30% bis 80% ACN, 20-25 min 80% ACN, 25-26 min 80% bis 30% ACN, 26-30 min 30% ACN). Das NHS-Hapten wurde durch Absorption bei 210 nm detektiert.

#### 5.1.5 Synthese von PETriN-CHA-BSA (Immunogen)

Bei der zuvor beschriebenen HPLC-Trennung von 90  $\mu\text{L}$  der PETriN-CHA-NHS-Lösung wurde der NHS-Ester im Zeitraum von 10,57 min bis 13,47 min detektiert und isoliert (Volumen: 9,73 mL) (Abb. 5.1).

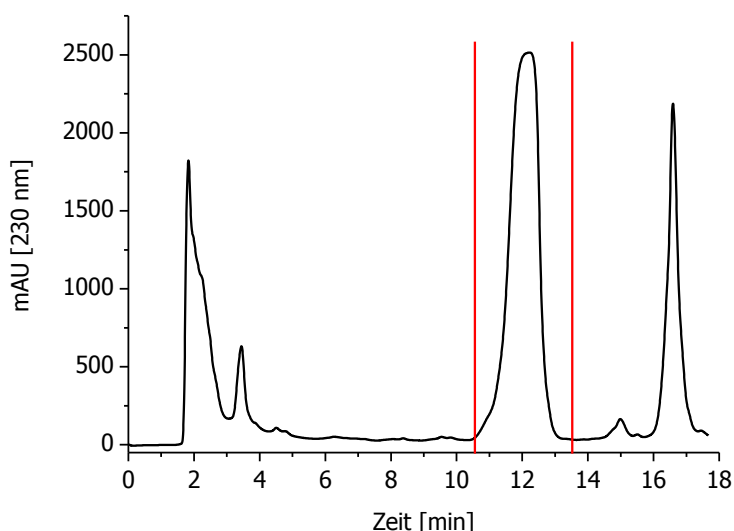


Abbildung 5.1: Präparative HPLC-Reinigung des NHS-PETN-Esters (Ester: markierter Bereich).

Zur Optimierung des Immunogens wurden verschiedene Ansätze zur Konjugation durchgeführt. Die BSA-Menge betrug stets 3,3 mg ( $\triangleq 0,05 \text{ mmol}$ ,  $M = 66430 \text{ g/mol}$ ), gelöst in 350  $\mu\text{L}$  0,13 M Natriumhydrogencarbonatlösung, pH 8,1. Zu diesen Aliquots wurden tropfenweise 200  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 800  $\mu\text{L}$ , 1600  $\mu\text{L}$  und 3200  $\mu\text{L}$  der gereinigten Haptenlösung zugegeben. Nach 15 h wurden die Reaktions-

ansätze 10 min bei 14000 g zentrifugiert und per Größenausschluss-Chromatographie wurden die Immunogene der ersten drei Ansätze mittels PD10-Säulen (Sephadex G25, GE Healthcare) aus dem Reaktionsgemisch isoliert und in verdünntem Phosphatpuffer (1 mM Natriumdihydrogenphosphat, 7 mM Natriumhydrogenphosphat, 14,5 mM Natriumchlorid) bei 4°C gelagert. Die durch Zugabe von 1600 µL und 3200 µL der Haptenlösung erhaltenen Konjugate waren in Wasser unlöslich. Da eine Reinigung dieser Proben mittels PD10-Säule nicht möglich war, wurden diese höher gekoppelten Proben folgendermaßen gereinigt: Das Protein in der getrockneten Probe wurde mit 100% ACN vollständig denaturiert. Zur Reinigung wurde die ACN-Phase abgenommen und das Pellet erneut mit ACN gewaschen. Zum Schluss wurden die Proben (Pellets) erneut getrocknet und versucht, Spuren des denaturierten Proteins mit Hilfe des Ultraschallbads in Wasser zu lösen.

Die Konjugationsdichten der Verbindungen wurden durch Messungen mit MALDI-TOF/MS (Reflex III, Bruker Daltonics) nach *Bahlmann et al.* bestimmt [238].

### 5.1.6 Synthese von PETriN-CHA-POD (Tracer)

Bei der HPLC-Reinigung von 15 µL der PETriN-CHA-NHS-Lösung wurde der NHS-Ester im Zeitraum von 12,00 min bis 12,89 min detektiert und isoliert (Volumen: 3,03 mL) (Abb. 5.2).

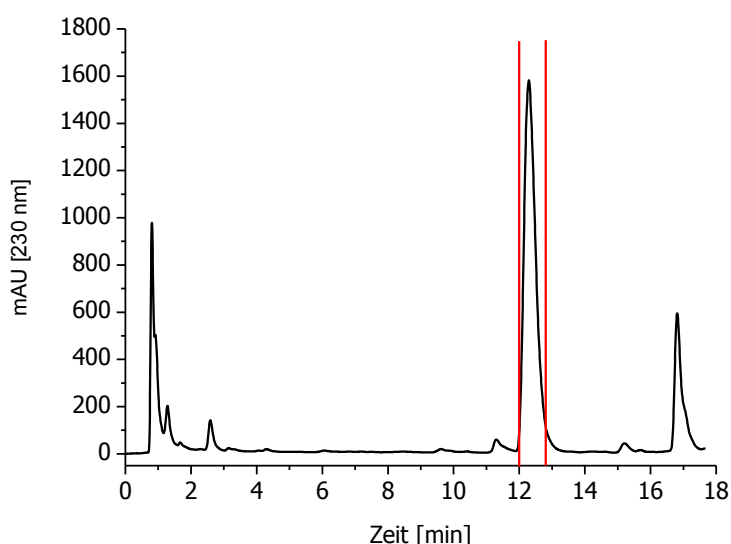


Abbildung 5.2: Präparative HPLC-Reinigung von PETriN-CHA-POD (Ester: markierter Bereich).

Zur Herstellung des Enzym-Konjugats, wurden zwei Aliquots mit jeweils 0,875 mg ( $\pm$  0,020 µmol) Meerrettich-Peroxidase (POD) in 850 µL 0,13 M Natriumhydrogencarbonatlösung verwendet. Zu der Enzymlösung wurden tropfenweise 400 µL bzw. 800 µL des NHS-Ester-Eluats (Anteil des Lösungsmittels ca. 50% Acetonitril) unter Rühren zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 120 min wurden die Konjugate mittels PD10-Säulen aufgereinigt und somit gleichzeitig umgepuffert (PBS). Die Konjugationsdichten der Verbindungen wurden durch MALDI-TOF/MS (Reflex III, Bruker Daltonics) nach *Bahlmann et al.* untersucht [238].

### 5.1.7 MALDI-TOF/MS

Zur Bestimmung der Kopplungsdichte wurden die Massen von BSA, POD sowie deren Konjugate bestimmt. Die MALDI-TOF/MS Messungen wurden an einem Bruker Reflex III System durchgeführt. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet. Für die Matrix wurden 10 mg Sinapinsäure in 1 mL

Acetonitril (1% TFA) - Reinstwasser-Gemisch (50:50) im Ultraschallbad gelöst und anschließend 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Je 1 µL des Überstands dieses Matrixansatzes wurde mit 1 µL der zu untersuchenden Probe in einem 0,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und anschließend auf die Spots des Probenträgers für die MALDI-Messung aufgetragen.

## 5.2 Immunisierungsprozess und Entwicklung des PETN-Immunoassays

Der Immunisierungsprozess zur Gewinnung der anti-PETN-Antikörper und der entwickelte PETN-Immunoassay, der sowohl zur Quantifizierung von PETN als auch zur Untersuchung der Antikörper gegen PETN verwendet wurde, wird nachfolgend beschrieben (Auswertung in Kap. 6).

### 5.2.1 Immunisierung eines Kaninchens mit PETriN-CHA-BSA-Immunogen

Die Immunisierungen wurden von Seramun Diagnostica durchgeführt. Ursprünglich sollten sie an zwei Kaninchen durchgeführt werden. Leider verstarb ein Versuchstier schon bevor das erste Serum entnommen werden konnte, sodass hier keinerlei Aussagen über die Anfangsimmunisierung vorliegen. Die Immunisierung wurde lediglich mit einem Kaninchen fortgesetzt. Dieses Kaninchen wurde subkutan mit PETriN-CHA-BSA immunisiert. Die ersten vier Boosts mit je 100 µg PETriN-CHA-BSA (107 µL, Konzentration: 0,94 g/L PETriN-CHA-BSA, Kupplungsdichte 14,2) wurden im Abstand von 14 Tagen verabreicht. Anschließend wurde dem Kaninchen Blut entnommen und das Serum (Serum 1) mittels PETN-ELISA (Kap. 5.2.2) untersucht. Bei den weiteren Auffrischungsimmunisierungen wurde das Intervall zwischen den Boosts verlängert und die Dosis wurde auf 50 µg PETriN-CHA-BSA (Serum 2-5) verringert.

### 5.2.2 PETN-ELISA

Die Durchführung dieses direkten, kompetitiven PETN-Immunoassays basiert auf einer leicht modifizierten Variante des Protokolls von Ramin *et al.* [5]. Die Kavitäten einer hochbindenden 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 200 µL einer anti-Kaninchen-IgG-Lösung (Acris R1364P) mit einer Verdünnung von 1:3000 (80 mM PBS, pH-Wert 7,6) gefüllt und über Nacht bei RT auf einem Mikrowellenschüttler mit 750 rpm geschüttelt. Um Verdunstungen vorzubeugen, wurde die Platte mit Parafilm verschlossen. Nach dreimaligen Waschen der Platte mit Waschpuffer (7 mM Kaliumphosphat, pH 7,6, 0,025 mM Kaliumsorbat, 0,05% Tween® 20) im MTP-Washer wurden die Kavitäten mit jeweils 200 µL des PETN-Serums mit einer Verdünnung von 1:50000 gefüllt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte der Kompetitionsschritt: Zuerst wurde die PETN-Probe zugegeben, anschließend der PETN-Tracer mit einer Verdünnung von 1:50000 (verdünnt mit PBS mit 0,1% BSA). Zur Kalibrierung wurden in drei Spalten der Mikrotiterplatte eine PETN-Standard-Verdünnungsreihe (acht Verdünnungen) aufgetragen (Dreifachmessung). Nach 45 min wurde die Platte gewaschen und die Kavitäten mit 200 µL TMB-Lösung gefüllt (8 mM Tetrabutylammoniumborhydrid, 40 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 1% Wasserstoffperoxid (30%-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1:2 in 220 mM Citratpuffer, pH 4 verdünnt, und 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µL 1 M Schwefelsäure pro Kavität gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem MTP-Photometer detektiert (Referenz 650 nm). Zur Erstellung der sigmoidalen Kalibrierkurve (n=3, n: Anzahl der Mehrfachmessung) wurde eine halblogarithmische Auftragung gewählt. Mithilfe der Software (SoftMax® Pro Version 5.3 bzw. Origin®) erfolgte der Fit über die 4-Parametergleichung (Bezeichnung dieser Fitfunktion in Origin: Kategorie: sigmoidaler Fit, Funktion: Logistic, Iterationsalgorithmus: *Levenberg Marquardt*) [239]:

$$Extinktion = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{C_{PETN}}{C}\right)^B} + D$$

(In Origin<sup>®</sup> werden die Konstanten folgendermaßen bezeichnet: A=A1, B=p, C=x0, D=A2.)

Die Konzentrationen der Lösungen für den ELISA sollten so gewählt werden, dass die niedrigste Konzentration nahe dem A-Wert liegt, die höchste nahe dem D-Wert. Der Messbereich um den Wendepunkt sollte möglichst breit sein, damit eine gute Auswertung dieses Assays möglich ist.

### 5.2.3 Bestimmung der Affinitätskonstanten aus der Kalibrierkurve

Die Affinitätskonstanten als Maß für die Stärke der Ligand-Analyt-Bindung wurden aus den Minima der IC<sub>50</sub>-Werte des kompetitiven ELISAs bestimmt (Kap. 2) [114].

$$K_A = \frac{1}{[c_{Antigen}]_{50}} = \frac{1}{[c_{Analyt}]_{50}} = 2 \cdot \frac{M}{IC_{50}}$$

Für die Kalibrierkurve zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde eine serielle Verdünnung von PETN-Standards in Wasser mit 32 Konzentrationen verwendet (in dreifacher Ausfertigung mit 1:1-Verdünnungen) statt der für Routineuntersuchungen deutlich kürzeren Kalibrierreihe mit 8 Verdünnungen. Nachweisgrenzen und die Grenzen der Quantifizierung wurden durch die Konstruktion eines Präzisionsprofils ähnlich des Konzepts von *Ekins* [117] bestimmt unter der Annahme eines mittleren relativen Fehlers von 2,5% des Signals und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Steigung der sigmoidalen Kurve.

### 5.2.4 Bestimmung von Kreuzreaktionen (KR)

Um die Selektivität der Antikörper zu prüfen, wurden die Kreuzreaktivitäten der anti-PETN-Antikörper zu den Analyten Pentaerythritoltetranitrat, Nitroglycerin, 2,4,6-Trinitrotoluol, 1,3,5-Trinitrobenzol, Hexogen, 2,4,6-Trinitroanilin, 1,3-Dinitrobenzol, Oktogen, Triacetontriperoxid, Ammoniumnitrat, 2,4,6-Trinitrophenol, Nitrobenzol, Pentaerythritol, Glycerin und den Natriumsalzen der Huminsäuren untersucht. Dazu wurden Stammlösungen der entsprechenden Substanzen in Methanol mit einer Konzentration von 1 g/L hergestellt. Diese wurden mit PBS pH 7,6 verdünnt, sodass ein Konzentrationsbereich analog zur PETN-Kalibrierkurve abgedeckt wurde (0-1000 µg/L). Da die Menge vom finalen Serum 5 am größten war, wurde dieses zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verwendet. Sowohl das Serum als auch die PETN-POD-Konjugatlösung wurde 1:50000 für den PETN-ELISA verdünnt. Um bei den Stoffen, die nur eine schwache Kreuzreaktivität aufweisen, einen sigmoidalen Verlauf zu erzwingen, wurde der Parameter D mit dem Parameter D der entsprechenden PETN-Kurve auf der gleichen Mikrotiterplatte gleichgesetzt (Kap. 2.1.4).

## 5.3 Prüfen der Trägermaterialien für die TNT-Affinitätssäulen

Für eine quantitative TNT-Bestimmung darf das Trägermaterial der TNT-Affinitätssäule TNT nicht unspezifisch binden. Deshalb wurden die Trägermaterialien zunächst deaktiviert, um die unspezifischen Bindungskapazitäten der verschiedenen Materialien zu TNT zu ermitteln (Auswertung in Kap. 7). Die Bestimmung erfolgte anhand des in diesem Kapitel aufgeführten TNT-ELISAs.

### 5.3.1 Säule mit deaktiviertem Fractogel® EMD-Epoxy

Eine Säule mit einem Volumen von 64,8 µL wurde trocken mit Fractogel® EMD-Epoxy gefüllt und mit 100 mM Tris geblockt (Inkubationszeit 3 h). Da beim Quellvorgang ein Volumen von 105 µL entstehen sollte, wurde die Säule zunächst nur leicht zuge dreht und mit Parafilm umwickelt. Überschüssiges Gel wurde mit einem Einwegspachtel abgestreift. Abschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen.

### 5.3.2 Säule mit deaktiviertem Toyopearl® AF-Tresyl

Eine Säule mit einem Volumen von 64,8 µL wurde trocken mit Toyopearl® AF-Tresyl gefüllt, mit 3 mL 10 mM Tris-Puffer geblockt und über Nacht bei 34°C temperiert. Da beim Quellvorgang ein Volumen von 75,25 µL entstehen sollte, wurde die Säule zunächst nur leicht zuge dreht und mit Parafilm umwickelt. Überschüssiges Gel wurde mit einem Einwegspachtel abgestreift. Abschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen.

### 5.3.3 Säule mit deaktiviertem Toyopearl® AF-Formyl

Eine Säule mit einem Volumen von 64,8 µL wurde mit Toyopearl® AF-Formyl nass gefüllt und mit 8 mL Reinstwasser gewaschen. Nach dem Spülen mit 5 mL PBS wurde die Säule mit 3 mL 100 mM Tris-Lösung, in welcher 3 mg NaCNBH<sub>3</sub> gelöst wurde, geblockt und bei 34°C für 3 h temperiert. Danach mit 3 mL TRIS-Lösung plus 3 mg NaCNBH<sub>3</sub> gespült und inkubiert (2 h bei 34°C). Abschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen.

### 5.3.4 Säule mit deaktivierter NHS-aktivierter Sepharose™

Eine Säule mit einem Volumen von 64,8 µL wurde mit NHS-aktivierter Sepharose™ nass gefüllt. Anschließend wurde diese mit 8 mL 1 mM HCl gespült, wobei die Säulenpackung verdichtet und Trägermaterial nachgefüllt werden musste. Mit 3 mL 100 mM Tris-Lösung wurde die Säule geblockt und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert und abschließend mit 5 mL PBS bei einem Fluss von 300 µL/min gewaschen.

### 5.3.5 Säule mit deaktivierter Formyl-Cellufine™

Eine Säule mit einem Volumen von 64,8 µL wurde zunächst trocken mit Formyl-Cellufine™ gefüllt, mit 5 mL PBS gespült, wobei die Säulenpackung verdichtet und Trägermaterial nachgefüllt werden musste. Anschließend wurde die Säule mit 4 mL Tris-Puffer plus 1,3 mL NaCNBH<sub>3</sub>-Lösung (7 mg in 7 mL Tris) geblockt (4 h bei RT und bei 4°C über Nacht) und abschließend mit PBS gewaschen.

### 5.3.6 TNT-Kapazitätsmessung der deaktivierten Säulen mittels ELISA

Die mit den verschiedenen geblockten Trägermaterialien gefüllten Säulen wurden mit PBS äquilibriert und anschließend mit verdünnter TNT-Lösung ( $3 \cdot 10^{-6}$  g/L) mit einem Fluss von 70 µL/min beladen. Der Durchlauf wurde in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aufgefangen, die zuvor mit anti-TNT-Antikörpern beschichtet wurde, aufgefangen ( $140 \mu\text{L}$ , entspricht:  $4,2 \cdot 10^{-10}$  g TNT je Kavität) und mittels kompetitiven TNT-ELISA ausgewertet (Kap. 5.3.7).

### 5.3.7 TNT-ELISA

Die grundlegende Durchführung des TNT-ELISAs entspricht der des PETN-ELISAs. Als Serum wurde das TNT-Serum K1B9 mit einer Konzentration von 1:400000 verwendet und als Tracer TNPHA-POD mit einer Konzentration von 1:800000 [5, 238]. Alle ELISA-Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler bei 750 rpm. Dabei wurden die Platten mit Parafilm abgedeckt, um eine Evaporation zu vermeiden. Als erstes wurden 96-Well-Platten mit 200 µL polyklonaler anti-Kaninchen-IgG-Lösung über Nacht (i. d. R. 19 h) beschichtet. Hierfür wurden die Antikörper 1:3000 in PBS, pH 7,6 verdünnt. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer unter Zuhilfenahme eines Waschautomaten gewaschen. Die Hyperimmuseren mit polyklonalen anti-TNT-Antikörpern wurden entsprechend den jeweiligen Erfordernissen mit PBS, pH 7,6 verdünnt. In jede Kavität wurden 200 µL des verdünnten Serums gegeben und für 1 h inkubiert. Um eine Kalibrierkurve zu erzeugen, wurde eine 5 g/L TNT-Stamm-lösung (in Methanol) verwendet, welche in PBS, pH 7,6 weiterverdünnt wurde, um letztlich 1:7 bzw. 1:10-Verdünnungsschritte im Konzentrationsbereich von 100 bis 0,0001 µg/L bzw. von 1000 µg/L bis 0,001 µg/L zu erzielen. Nach drei Waschzyklen wurden 100 µL der Kalibrierlösungen als Triplikate in die Kavitäten pipettiert, unmittelbar gefolgt von der Zugabe von 100 µL Tracerlösung (1:800000 Verdünnung des 6-TN6PHA-POD in PBS mit 0,1% BSA). Die Konkurrenz um freie Bindungsstellen der primären Antikörper erfolgte innerhalb eines 30-minütigen Inkubationsschrittes. Diese wurde durch dreimaliges Waschen der Platte mit Waschpuffer abgestoppt. Daraufhin wurden 200 µL einer TMB-haltigen Substratlösung hinzugefügt [240]. Die Substratlösung wurde stets unmittelbar vor der Auftragung auf die Platte frisch hergestellt und bestand aus 21,6 mL Citratpuffer, 8,34 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3,8 mmol/L) und 540 µL der TMB-Lösung. Um die durch die Peroxidase vermittelte Blaufärbung optisch zu kontrollieren, wurde bei diesem Inkubationsschritt auf die Abdeckung mit Parafilm verzichtet. Die Enzymreaktion wurde mit 100 µL einer 1 mol/L Schwefelsäure abgestoppt, welche mit einem Farbumschlag ins Gelbe einhergeht. Die Vermessung erfolgte in einem SpectraMax plus 384 Microplate-Reader, welcher die Platte unmittelbar vor der Auslesung noch einmal schüttelt. Die Absorption bei 450 nm sowie bei 620 nm wurden als Referenzwellenlänge ermittelt.

## 5.4 Immobilisierungsmethoden von Trisopor™

Aus dem nativen Trisopor™-Material wurde durch Epoxysilanisierung ein epoxy-aktiviertes Trägermaterial hergestellt. Die funktionellen Gruppen des Trägermaterials Amino-Trisopor™ sind Aminogruppen. Diese wurden mittels der Bis-NHS-Ester-Methode aktiviert (Kap. 7.6.1). Die daraus resultierende Ligandendichte wurde durch anschließende Hydrolyse bestimmt (Auswertung in Kap. 7). Zusätzlich wurde der optimale pH-Wert zur Immobilisierung via Bis-NHS-Ester-Methode untersucht (Auswertung in Kap. 8). Außer dieser Methode wurden Immobilisierungen mittels der bewährten Glutaraldehyd-Methode sowie mit Glutarsäureanhydrid und anschließender NHS-Aktivierung durchgeführt (Auswertung in Kap. 8).

### 5.4.1 Epoxysilanisierung

Um bei der Epoxysilanisierung eine hohe Beladung mit Epoxygruppen zu erzielen, bietet sich eine saure bzw. basische Reinigung der Oberfläche zur Aktivierung an. Für die saure Aktivierung wurden 0,2 g Trisopor™ 1500 (nativ) mit 1,5 mL HCl in EtOH (2,85 mL 32%-ige HCl in 24 mL EtOH), bei 80°C im Thermoschüttler über Nacht geschüttelt. Danach wurde das Material mehrfach mit EtOH gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Für die basische Oberflächenreinigung wurden

0,2 g Trisopor™ 1500 (nativ) mit 1 mL basischer Lösung (25%-ige  $\text{NH}_3$ +30%-ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Mischungsverhältnis 3:1, Verdünnung 1:2 mit Reinstwasser) 20 min bei 1000 rpm geschüttelt. Nach mehrfachem Waschen mit ACN wurde das Material über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Für die Epoxysilanisierung wurden 50  $\mu\text{L}$  Glycidoxypentyltrimethoxysilan in 5 mL ACN verdünnt und mit 50  $\mu\text{L}$  Reinstwasser versetzt. Es wurden drei verschiedene Proben (jeweils 0,2 g poröses Glas) silanisiert, eine mit saurer, eine mit basischer und eine ohne vorheriger Aktivierung der Oberfläche. Diese wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 1,5 mL Glycidoxypentyltrimethoxysilanlösung für 1 h bei 30°C mit 1000 rpm geschüttelt und anschließend mit ACN gewaschen und im Exsikkator getrocknet [138].

#### 5.4.2 NHS-Aktivierung von Amino-Trisopor™ und anschließende Hydrolyse

Vier Ansätze (zweimal 20 mg Amino-Trisopor™ 1500 ( $\cong 4,87 \mu\text{mol}$  Aminogruppen) und zweimal 20 mg Amino-Trisopor™ 3000 ( $\cong 1,905 \mu\text{mol}$  Aminogruppen)) wurden in 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Vakuumtrockenschrank bei 100°C (1,5 h) erhitzt. 35,6 mg Bis-NHS-Diglykolsäure ( $\cong 108,4 \mu\text{mol}$ ,  $M = 328,23 \text{ g/mol}$ ) wurden in 600  $\mu\text{L}$  Dioxan gelöst und 15  $\mu\text{L}$  Triethylamin ( $\cong 108,2 \mu\text{mol}$ ,  $M = 101,19 \text{ g/mol}$ ; Dichte = 0,73 g/mL) hinzugefügt. Je 150  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden zu den Trisopor™-Proben gegeben und für 2 h unter Schütteln (waagrecht bei 1400 rpm) inkubiert. Um den überschüssigen Bis-NHS-Ester zu entfernen, wurde dreimal mit 400  $\mu\text{L}$  0,1 M Citratpuffer, pH 4, einmal mit 400  $\mu\text{L}$  0,1 M Phosphatpuffer, pH 6 und zweimal mit 400  $\mu\text{L}$  0,01 M Phosphatpuffer, pH 6 gewaschen. Das letzte Washwasser wurde als Referenz gesammelt.

Um den Ester zu hydrolysieren, wurden 100  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer, pH 8,3 zu den NHS-aktivierten Trägermaterialien gegeben. Die Proben wurden 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Überstände sowie die letzten Washwasserüberstände spektroskopisch auf NHS untersucht (Detektion bei 261 nm).

Um die frühzeitige Hydrolyse durch die Waschvorgänge mit Puffer zu unterbinden, wurde der Versuch analog, jedoch ohne Verwendung wässriger Pufferlösungen, durchgeführt (dreimaliges Waschen mit Dioxan und sechsmaligen Waschen mit ACN).

#### 5.4.3 pH-Optimierung der Immobilisierung mittels Bis-NHS-Ester-Methode

Je 1,5-mL-Reaktionsgefäß wurden 20 mg Amino-Trisopor™ 1500 eingewogen. Diese wurden bei 100°C im Ofen ausgeheizt (1,5 h) und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Von einer Lösung mit 80,2 mg Bis-NHS-Diglykolsäure in 1,4 mL Dioxan und 35  $\mu\text{L}$  Triethylamin wurden jeweils 150  $\mu\text{L}$  in die Reaktionsgefäße mit dem getrockneten Amino-Trisopor™ gegeben und 3 h bei 1100 rpm bei RT geschüttelt. Um überschüssigen Bis-NHS-Ester und Dioxan zu entfernen, wurde der Überstand entfernt und mit 0,01 M Phosphatpuffer gewaschen. Die beiden letzten Schritte wurden drei- bis viermal wiederholt. Zur Immobilisierung wurden BSA-Lösungen (2 mg/mL) mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Die Immobilisierung wurde über Nacht bei RT auf dem Schüttler (1400 rpm) durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe lagen die pH-Werte zwischen 6,13 und 8,32, bei der zweiten zwischen 4,01 und 6,13. Der Immobilisierungserfolg wurde mittels BCA-Test bestimmt. Der BCA-Test wurde gemäß der Herstellerangaben des Kits im Mikrotiterformat durchgeführt [241].



#### 5.4.4 Aktivierung mittels Glutaraldehyd-Methode

25 mg Amino-Trisopor™ 1500 wurden mit 200  $\mu$ L 12,5%-Glutaraldehydlösung (50  $\mu$ L 25%-ige Glutaraldehydlösung, verdünnt mit 150  $\mu$ L PBS) und 15 mg NaCNBH<sub>3</sub> versetzt. Dieser Ansatz wurde für 18 h inkubiert. Anschließend wurde das nun mit Aldehydgruppen aktivierte Material mit 0,1 M PBS gewaschen [134].

#### 5.4.5 NHS-Aktivierung nach Reaktion mit Glutarsäureanhydrid

52,9 mg Glutarsäureanhydrid wurden in 1,3 mL Dioxan gelöst. Es wurden verschiedene Mengen von Trisopor™ 1500 eingewogen (17,1 mg, 16,5 mg, 62,8 mg) zu den folgende Mengen an Glutarsäureanhydridlösung hinzugegeben wurden: 151  $\mu$ L, 146  $\mu$ L bzw. 557  $\mu$ L. Die entsprechenden Einwaagen von Amino-Trisopor™ 3000 waren 19,1 mg, 16,5 mg und 63,4 mg, denen 66  $\mu$ L, 58  $\mu$ L bzw. 220  $\mu$ L an Anhydridlösung zugegeben wurden (Reaktionszeit 3,5 h bei 40°C). Um überschüssiges Anhydrid zu entfernen, wurde dreimal mit Dioxan gewaschen [132].

### 5.5 Dabsyl-Methoden zur Bestimmung von Immobilisierungsdichten

Durch gefärbte Proteine soll eine direkte Einschätzung der Immobilisierungsdichte anhand der Farbintensität des gekoppelten Materials erfolgen. So können geeignete Immobilisierungsmethoden bzw. geeignete Affinitätsmaterialien getestet werden. Hierzu wurden Dabsyl-BSA und Dabsyl-IgG hergestellt. Durch Reduzierung des Lösungsmittelanteils und Verlängerung der Zeit während der Herstellung der Proteinkonjugate wurde einer vollständigen Denaturierung der Proteine entgegengewirkt. Zur Quantifizierung des Immobilisierungserfolgs der unterschiedlichen Verfahren wurden Teilhydrolysen der gefärbten Affinitätsmaterialien in der Mikrowelle durchgeführt (Auswertung in Kap. 8).

#### 5.5.1 Herstellung von Dabsyl-BSA

1,176 mg Dabsylchlorid ( $\cong 3,631 \mu\text{mol}$ ) wurden in 300  $\mu$ L Aceton gelöst. Diese Lösung wurde zu einer BSA-Lösung (24,4 mg  $\cong 0,369 \mu\text{mol}$  BSA in 1,2 mL 0,2 M Carbonatpuffer, pH 9) gegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Abschließend erfolgte eine fraktionierte Trennung durch Größenausschluss-Chromatographie mittels PD10-Säule. Die Dabsyl-BSA-Fraktionen wurden vereinigt und die Extinktion bei 473 nm gemessen (Verdünnung 1:50). Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### 5.5.2 Herstellung von überwiegend nativen Dabsyl-markierten BSA

187,9 mg ( $\cong 2,847 \text{ mmol}$ ) BSA wurden in 17,81 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, pH 8,2 gelöst und 8,3 mg ( $\cong 25,633 \text{ mmol}$ ) Dabsylchlorid in 980  $\mu$ L ACN. Die Dabsyllösung wurde unter Rühren zu der BSA-Lösung zugegeben, sodass eine Reaktionsmischung mit einer Lösungsmittelkonzentration von 5% ACN und einer BSA-Konzentration von ca. 10 mg/mL entstand. Die Mischung wurde 24 h bei 37°C gerührt. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Trennung mittels Größenausschluss-Chromatographie (PD10-Säule) und nach Vereinigung der Dabsyl-BSA-Fraktionen wurde die vereinigte Lösung sterilfiltriert. Die Extinktion dieser Dabsyl-BSA-Lösung wurde bei 473 nm bestimmt (Verdünnung 1:10). Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 5.5.3 Herstellung von Dabsyl-IgG

1,0 g Rinder-IgG ( $\cong 6,944 \mu\text{mol}$ ) wurden in 90 mL 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, pH 8,2 gelöst und 3,7 mg Dabsylchlorid ( $\cong 11,46 \mu\text{mol}$ ,  $M = 323,80 \text{ g/mol}$ ) in 9,5 mL ACN. Daraus ergab sich ein Molverhältnis beider Substanzen von  $6,944:11,4 \approx 1:1,65$ . Die IgG-Konzentration betrug 10,05 g/L. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung mittels PD10-Säule gereinigt und die vereinigte Dabsyl-IgG-Fraktion sterilfiltriert und spektroskopisch vermessen. Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 5.5.4 Unterschiedliche Immobilisierungsmethoden für Amino-Trisopor™

Es wurden viermal je 10 mg Amino-Trisopor™ 1500 und Amino-Trisopor™ 3000 in 1,5-mL-Reaktionsgefäße eingewogen, sowie die auf drei verschiedenen Weisen (ohne, saure bzw. basische Vorbehandlung) hergestellten epoxy-aktivierten Trisopor™ -Proben verwendet (10 mg) (Kap. 5.4.1). Zur Proteinimmobilisierung wurden je 20  $\mu\text{L}$  Dabsyl-BSA-Lösung (0,301 mM, Kopplungsdichte 3,2) mit jeweils 40  $\mu\text{L}$  für die Immobilisierungsmethode geeigneten Puffer verdünnt. Für die Glutaraldehyd-Methode wurde 80 mM PBS plus 6 mg  $\text{NaCNBH}_3$ , für die Bis-NHS-Ester-Methode 0,1 M Hydrogencarbonatlösung, pH 8,3, für die NHS-Kopplung nach anfänglicher Umsetzung mit Glutarsäureanhydrid 80 mM PBS, pH 7,6 und für die Epoxy-Methode 0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,6 genutzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Materialien mehrfach mit PBS gewaschen.

### 5.5.5 Immobilisierungen von Dabsylproteinen

Um die Immobilisierungsdichte der Dabsylproteine zu vergleichen, wurden die gleichen Mengen an gefärbtem Protein zu den gleichen Mengen an Trägermaterialien gegeben. Die Immobilisierungsvorschriften sind im Kapitel 5.6 aufgeführt.

Konzentration der Proteinlösung zur Immobilisierung je Ansatz (50 mg Trägermaterial):

300  $\mu\text{L}$  Dabsyl-IgG (5,49 mg/mL) und 150  $\mu\text{L}$  Puffer ( $\Rightarrow 3,66 \text{ mg/mL}$  IgG) bzw.

60  $\mu\text{L}$  Dabsyl-BSA (14,26 mg/mL) und 240  $\mu\text{L}$  Puffer ( $\Rightarrow 2,85 \text{ mg/mL}$  BSA).

### 5.5.6 Partielle Hydrolyse mittels Mikrowelle

In einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurden ca. 20 mg Trägermaterial mit 300  $\mu\text{L}$  6 M HCl versetzt. Die Hydrolyse fand in offenen Gefäßen statt, um eine Evakuierung und Spülung mit Stickstoff zu ermöglichen. Durch gleichmäßige Energiezufuhr sollte möglichen Siedeverzügen entgegengewirkt werden. Da es bei zu starker Energiezufuhr zur Zerstörung des Farbstoffes kommen würde, wurde die Energiezufuhr auf 75 W beschränkt. Die Methodenregelung der Mikrowelle erfolgte mit "Powertime", d. h. es wurde kontinuierlich die gleiche Leistung zugeführt. Die Zeit der Energiezufuhr betrug 3 min, dabei wurde das Wasser im Reaktionsgefäß (10 mL) gerührt (stirred: hi). Als zusätzliche Grenzen für die Hydrolyse wurden ein maximaler Druck von 6,9 bar und eine Temperatur von 130°C festgesetzt.

## 5.6 Immobilisierungsmethoden für verschiedene Trägermaterialien

Die konkreten Immobilisierungsprotokolle sind in diesem Kapitel aufgeführt. Den Materialien in Kapitel 5.6.1 bis 5.6.6 lagen Immobilisierungsprotokolle der Herstellerangaben zu Grunde. Für die Materialien, denen keine Vorschriften beilagen, erfolgten die Kopplungen angelehnt an den Methoden

nach der entsprechend zitierten Literatur (Kap. 5.6.7 bis 5.6.9). Die Immobilisierungsdichte der aufgeführten Materialien wurde mittels der Dabsylmethode überprüft (Auswertung in Kap. 8).

#### **5.6.1 Immobilisierung auf Toyopearl® AF-Formyl**

Toyopearl® AF-Formyl wird zu Beginn gründlich mit Reinstwasser und anschließend mit 0,1 M PBS, pH 7 gewaschen. 2 g des nassen Harzes werden auswogen und 40-50 mg Protein, gelöst in Pufferlösung, pH 6,5-9,0 zum Harz geben. Zusätzlich werden 60 mg NaCNBH<sub>3</sub> hinzugeben und die Reaktionsmischung inkubiert über Nacht. Danach werden die restlichen Formylgruppen mit 8 mL 1 M Tris-HCl, pH 7,8 plus 20 mg NaCNBH<sub>3</sub> geblockt (1h). Das Material wird mit 1 M NaCl und abschließend mit PBS gewaschen. Eine Belegung von 25 mg/g Trägermaterial ist möglich [242].

#### **5.6.2 Immobilisierung auf Tresyl-Toyopearl® 650M**

Das zu immobilisierende Protein wird in 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung, 0,5 M NaCl, pH 8 gelöst. 0,4 g des trockenen Harzes werden zur Proteinlösung gegeben. Nach der Inkubation (4 h) wird dreimal mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die freien Tresylgruppen werden mit 10 mL 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 geblockt (1 h) und das Material wird mit PBS gewaschen [243, 244].

#### **5.6.3 Immobilisierung auf Cellufine™-Formyl**

Der pH-Wert des Kopplungspuffers sollte zwischen pH 4 und 11 liegen. Beispielsweise kann 0,2 M Phosphat- oder 0,2 M Acetatpuffer verwendet werden. Als Blockingpuffer können 0,2 M bis 1 M Lösungen primärer Aminverbindungen, wie Ethanolamin, Glycin, Glycinethylester oder 0,2 M bis 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7-8 eingesetzt werden. Als Reduktionsmittel wird NaCNBH<sub>3</sub>, pH > 4 genutzt.

Nach der Immobilisierungsvorschrift wird 1 mL Cellufine™-Formyl mit Kopplungspuffer gewaschen. In 1-2 mL Kopplungspufferlösung wird das Protein gelöst und zusammen mit 5-10 mg Reduktionsmittel (alternativ als Lösung: 1 mL 50-100 mg/mL) zum Trägermaterial gegeben (Inkubationszeit 2 bis 8 h). Danach wird mit 20 mL Kopplungspuffer gewaschen und mit 1-2 mL Blocklösung plus Reduktionsmittel die noch freien Gruppen geblockt (Inkubationszeit 2 h). Anschließend wird nochmals mit 20 mL Kopplungspuffer oder Reinstwasser gewaschen [245].

#### **5.6.4 Immobilisierung auf NHS-Sepharose™**

Um eine vorzeitige Reaktion zu unterdrücken, werden kalte Lösungen verwendet (4°C) und kurze Zeitintervalle bei den Waschschritten eingehalten. Als Kopplungspuffer kann 0,2 M Natriumhydrogencarbonat (pH 6-9) oder 0,2 M PBS, 0,5 M NaCl, pH 8,3 verwendet werden (Verhältnis Kopplungspuffer zum Medium 1:2).

NHS-aktivierte Sepharose™ wird mit dem 10-15-fachen des Volumens mit kalter 1 mM HCl gewaschen. Das gewaschene Gel wird danach kurz mit der Kopplungslösung gewaschen, um den pH-Wert zur Immobilisierung anzugleichen. Nach Zugabe der Proteinlösung (in PBS) soll die Reaktionsmischung 2-4 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubieren. Das Blocken erfolgt mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 oder 0,5 M Ethanolamin. Anschließend wird das Material im Wechsel mit 0,1 M Tris, pH 8-9 und 0,1 M Acetatpuffer, 0,5 M NaCl, pH 4-5 gewaschen (immer drei Säulenvolumen im Wechsel, drei bis sechsmal wiederholen). Abschließend wird mit PBS gewaschen [246].

### 5.6.5 Immobilisierung auf NHS-aktivierte Agarose

Als Kopplungspuffer werden 0,1 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,2 oder andere aminfreie Puffer, pH 7-9 verwendet. Die Kopplungskapazität beträgt 1-20 mg/mL, wobei 150 mg trockenes Harz ca. 1 mL hydratisiertes Gel ergibt. Für die direkte Kopplung der Proteinlösung am trockenen Gel wird das doppelte Volumen, das zum Quellen benötigt wird, verwendet, d. h. 2 mL statt 1 mL bei 150 g Agarose. Das Blocken erfolgt mit 1 M Tris, pH 7,4 oder 1 M Ethanolamin. Danach wird das Material mit PBS, dann mit 1 M NaCl-Lösung – um unspezifische Bindungen zu entfernen – und abschließend mit PBS gewaschen [247].

### 5.6.6 Immobilisierung auf UltraLink™ Biosupport

Die Proteinlösung wird in einer geeigneten Lösung (0,6 M Natriumcitrat oder 0,8 M Natriumsulfat) zu den trockenen Beads gegeben und bei RT geschüttelt (1 h). Nach 5-10-minütigen Zentrifugieren bei 1200 g wird der Überstand abgenommen. Geblockt wird mit dem 10-fachem Beadvolumen mit 1 M oder 3 M Ethanolamin, pH 9; 1 M Tris, pH 8 oder 0,1 M Glucosamin in 1 M Natriumsulfat, pH 8,5), indem 2,5 h bei RT der Ansatz geschüttelt wird. Anschließend wird für 5-10 min bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Material wird mehrfach mit PBS (10-fachem Beadvolumen) gewaschen (15 min geschüttelt und abzentrifugiert). Danach mit 1 M NaCl und abschließend mit PBS gewaschen.

### 5.6.7 Immobilisierung auf Fractogel® EMD-Epoxy

100 mL Epoxy-Matrix in 100 mL Puffer, pH 9-13 quellen lassen. Zur Immobilisierung wird Carbonatpuffer, pH 9 mit 5-10 mg/mL Protein verwendet. Der Ansatz wird bei 35°C 24 bis 48 h geschüttelt und anschließend mit 1 M NaCl und danach mit Reinstwasser gewaschen. Mit 100 mL 1 M Ethanolamin oder Tris, pH 9 bei RT (6 h inkubieren) werden die noch freien Epoxygruppen geblockt und anschließend mit 1 M NaCl und abschließend mit Reinstwasser gewaschen. Zum Koppeln von Hydroxylgruppen wird ein pH-Wert von 11-12 benötigt, für Aminogruppen ein pH > 9 und für Thiolgruppen ein pH-Wert von 7,5-8,5 [134]. Alternativ kann eine Immobilisierung ohne vorheriges Quellen durchgeführt werden. Dazu wird die Proteinlösung in 0,1 M Carbonatpuffer, 0,15 M NaCl, pH 9,6 hergestellt. Falls die Proteinlösung in PBS vorliegt, wird diese im Verhältnis Carbonatpuffer:PBS = 2:1 verdünnt. Diese Lösung wird zum trockenen Fractogel® EMD-Epoxy geben (42 h inkubieren). Der Überstand wird abgenommen und das Material mit 0,01 M Trispuffer, 0,15 M NaCl, pH 8,5 geblockt und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen [122].

### 5.6.8 Immobilisierung auf Amino-Trisopor™ via Glutaraldehyd-Methode

25 mg Amino-Trisopor™ werden mit Reinstwasser und abschließend mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 0,15 M NaCl, pH 7,0 gewaschen. Der Überstand wird entfernt und 200 µL 12,5%-ige Glutaraldehydlösung in PBS plus 5,0 mg Natriumcyanoborhydrid (gelöst in 10 µL PBS) werden zum Amino-Trisopor™ hinzugeben (4 h inkubieren). Nach Entfernen des Überstands wird mehrfach das Trägermaterial mit PBS waschen, um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen. Anschließend wird der Überstand entfernt und 40 µL Proteinlösung (Konzentration 1-20 mg/mL, für kleine Liganden ist meist eine Proteinkonzentration von 1-5 mg/mL ausreichend) zusammen mit 5,0 mg Natriumcyanoborhydrid (gelöst in 10 µL PBS) zum Trägermaterial hinzugefügt (4 h bei RT schütteln). Danach wird das Trägermaterial mit PBS, dann mit 1 M NaCl und abschließend mit PBS gewaschen [134].

### 5.6.9 Immobilisierung auf Amino-Trisopor™ via Bis-NHS-Ester-Methode

41,5 mg Trisopor™ werden im Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und 2 h im Exsikkator getrocknet. 10,5 mg Bis-NHS-Diglykolsäure ( $\pm 32 \mu\text{mol}$ ,  $M = 328,23 \text{ g/mol}$ ) werden in 300  $\mu\text{L}$  Dioxan gelöst und 10  $\mu\text{L}$  Triethylamin hinzugefügt. Diese Lösung wird zum getrockneten Trägermaterial gegeben und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach Abnahme des Überstands wird das Trägermaterial gründlich mit Dioxan gewaschen, um den überschüssigen Bis-NHS-Ester zu entfernen. Anschließend wird mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6 das organische Lösungsmittel entfernt. Danach wird die Proteinlösung, pH 8,3 dazugeben (z. B. in Natriumhydrogencarbonatlösung) und 5 h bei RT geschüttelt. Der Überstand wird entfernt und das Material gründlich mit PBS gewaschen.

## 5.7 Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA-Verfahren)

Um eine breiter anwendbare Proteinbestimmungsmethode zur Bestimmung der Immobilisierungsdichten von Affinitätsmaterial zu gewinnen, wurde eine vereinfachte Aminosäureanalyse mit internem Standard entwickelt (Kap. 8). Dieses Verfahren wurde mit Aminosäure-NIST-Lösung kalibriert. Zur Proteinbestimmung wurde diese Methode mit zertifiziertem BSA-NIST-Standard validiert, wobei die Aminosäuredetektion nach der Hydrolyse der Probe erfolgte. Es wurden Peptidproben und komplexe Proteinproben untersucht. Zusätzlich wurde das Verfahren zur Bestimmung von Immobilisierungsdichten an verschiedenen Trägermaterialien angewandt.

### 5.7.1 Vorexperimente zur Entwicklung des AAAA-Verfahrens

Zu Beginn wurden die beiden homologen Aminosäure Homophenylalanin (HPhe),  $M = 179,22 \text{ g/mol}$  (0,0896 g in 20 mL 0,1 N HCl  $\pm 25 \text{ mM}$ ) und Homotyrosin (HTyr·HBr),  $M = 276,12 \text{ g/mol}$  (0,1381 g in 20 mL 0,1 N HCl  $\pm 25 \text{ mM}$ ) als interner Standard verwendet. Aus diesen beiden Lösungen wurde eine Standardlösung mit jeweils 1 mM HPhe und 1 mM HTyr hergestellt. Um Reaktionen der Aminosäuren während der Proteinhydrolyse zu unterbinden, wurde zunächst Phenol (s) zugesetzt. In der Literatur sind Zusätze zwischen 0,02% und 3% während der Hydrolyse dokumentiert [207, 218-220]. Aufgrund der Ergebnisse der Vorexperimente wurde für Phe auf den internen Standard FPhe gewechselt und vom Additiv Phenol bei der Hydrolyse abgesehen, sodass folgende Methode validiert wurde:

### 5.7.2 Das AAAA-Verfahren

Für das AAAA-Verfahren wurden interne Standards auf Basis von Phe und Tyr verwendet: 4-Fluorphenylalanin (FPhe),  $M = 183,18 \text{ g/mol}$  (0,0916 g in 20 mL 0,1 N HCl  $\pm 25 \text{ mM}$ ) und Homotyrosin (HTyr·HBr),  $M = 276,12 \text{ g/mol}$  (0,1381 g in 20 mL 0,1 N HCl  $\pm 25 \text{ mM}$ ). Aus diesen beiden Stammlösungen wurde eine Standardlösung mit 1 mM FPhe und 1 mM HTyr hergestellt. Die Kalibrierlösung basiert auf dem Aminosäure-NIST-Standard-Referenzmaterial (NIST 2389a), einer Mischung aus 17 Aminosäuren (2,50  $\pm$  0,07 mM L-Alanin, 2,51  $\pm$  0,07 mM L-Arginin, 2,50  $\pm$  0,08 mM L-Asparaginsäure, 1,23  $\pm$  0,06 mM L-Cystin, 2,50  $\pm$  0,08 mM L-Glutaminsäure, 2,52  $\pm$  0,07 mM Glycin, 2,52  $\pm$  0,07 mM L-Histidin, 2,44  $\pm$  0,11 mM L-Isoleucin, 2,44  $\pm$  0,11 mM L-Leucin, 2,41  $\pm$  0,17 mM L-Lysin, 2,51  $\pm$  0,07 mM L-Methionin, 2,55  $\pm$  0,09 mM L-Phenylalanin, 2,46  $\pm$  0,11 mM L-Prolin, 2,44  $\pm$  0,11 mM L-Serin, 2,49  $\pm$  0,07 mM L-Threonin, 2,54  $\pm$  0,08 mM L-Tyrosin, 2,51  $\pm$  0,10 mM L-Valin) in 0,1 N HCl). L-Tryptophan, L-Asparagin und L-Glutamin wurden dem L-Aminosäure-Satz (Sigma-Aldrich LAA21) entnommen.

Die saure Hydrolyse der Proteinproben wurde in einem Hydrolyseröhrchen durchgeführt. 20 µL Proteinlösung wurden mit 200 µL 6 M HCl verdünnt und 5 µL interner Standard zugegeben. Die gründlich gemischte Lösung wurde in ein Hydrolyseröhrchen überführt. Dieses wurde dreimal mit Stickstoff gespült und evakuiert. Das evakuierte Hydrolyseröhrchen wurde auf 107°C für etwa 22 h in einem Ölbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Inhalt in ein 1,5-mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 60°C bis zur Trockene evaporiert. Das Pellet wurde in 200 µL Reinstwasser gelöst und die Lösung chromatographisch an der HPLC analysiert. Die folgenden Trennbedingungen wurden verwendet: Mobile Phase A: Wasser mit 0,05% TFA, Laufmittel B: Acetonitril mit 0,05% TFA, Flussgeschwindigkeit 0,15 mL/min, Säulentemperatur 50°C, UV-Detektion bei 215 nm. 20 µL der Probe wurden auf die Säule AdvanceBio Peptide Map C18 Umkehrphasensäule (150 x 2,1 mm, mit der Vorsäule AdvanceBio Peptide Map Fast Guard 2.1mm x 5 mm, 2.7 µm) injiziert. Die Abtrennung der aromatischen Aminosäuren wurde auf einem bioinerten Agilent 1260 Infinity-System durchgeführt. Der lineare Gradient begann direkt bei 0% Acetonitril und erreichte 30% Acetonitril nach 40 min. Der zweite Schritt war ein Reinigungsschritt mit einem steilen Gradienten (2 min) von 30% bis 90% Acetonitril (3 min Haltezeit). Nach der Rückkehr innerhalb von 1 min auf die Startbedingung wurde 19 min mit der mobilen Phase A äquilibriert.

Zur Validierung wurde eine Verdünnung von 1:200 von BSA-NIST-Standard Referenzmaterialien SRM 927e mit PBS verwendet. Zertifizierte Werte der BSA-Lösung: Konzentration etwa 7%, bezogen auf AAA: 67,38 g/L  $\pm$  1,38 g/L, BSA-Konzentration (Biuret-Methode): 69,58 g/L  $\pm$  1,30 g/L, Dichte: 1,0182  $\pm$  0,0002 g/mL, Theoretische Masse: 66398,1 g/mol, Masse (in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit): 66431,3  $\pm$  0,9, 66548,9  $\pm$  0,8, 66458  $\pm$  1, 66590  $\pm$  6. Die Anzahl der aromatischen Aminosäuren in der Sequenz sind 20 Tyr und 27 Phe.

### 5.7.3 Protein Quantifizierung von Peptiden und komplexen Proben

Als Peptidprobe wurde Hepcidin-25 (M = 2789,4 g/mol) mit der Sequenz: Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-Cys-Ile-Phe-Cys-Cys-Gly-Cys-Cys-His-Arg-Ser-Lys-Cys-Gly-Met-Cys-Cys-Lys-Thr hydrolysiert und analysiert. Außerdem wurden folgende komplexe Proben untersucht: Kaninchenserum (Vorverdünnung 1:500), Mausserum (Vorverdünnung 1:500), Humanserum (Vorverdünnung 1:500), Rinder-IgG (0,2 g/L Rinder-IgG) und Magermilchpulver (1 g/L Magermilchpulver).

### 5.7.4 Analyse von inhomogenen Proben: Trägermaterial mit immobilisierten BSA

Rinderserumalbumin (BSA, 35 µL einer 10 g/L Lösung) wurde auf Tresyl-Toyopearl® und Fractogel® EMD-Epoxy gemäß den Anweisungen des Herstellers und auf zwei Proben von Trisopor™-Amino 1500 immobilisiert, einmal mittels Glutaraldehyd-Methode zum anderen mittels des Bis-NHS-Ester-Verfahrens (Kap. 5.6.9). Für die Analyse von immobilisiertem Protein wurde jedes Material getrocknet und 5 mg des Materials mit 20 µL der internen Standardlösung in 200 µL 6 M HCl hydrolysiert, um die Immobilisierungsdichte zu bestimmen.

Die exakten Immobilisierungsschritte: Es wurden jeweils 30 mg des Trägermaterials zur Immobilisierung verwendet. Zur Aktivierung des Amino-Trisopor™ wurden 200 µL einer 12,5% Glutaraldehydlösung und 15 mg Natriumcyanoborhydrid zu dem Material gegeben. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden 35 µL 10 mg/mL BSA-Lösung mit zusätzlichen 15 mg Natriumcyanoborhydrid für die Immobilisierung verwendet und 15 h und inkubiert. Nachdem das Material mit PBS gewaschen wurde, wurde es mit 200 µL 0,1 M Tris und 15 mg Natriumcyanoborhydrid blockiert und abschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Beim alternativen Aktivierungsverfahren wurden 38,5 mg Bis-NHS-Diglykolsäure und 10 µL Triethylamin in 600 µL wasserfreiem Dioxan gelöst und zum Amino-Trisopor™ 1500 gegeben. Nach 3 h Inkubation wurde das Material viermal mit Dioxan und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 35 µL BSA-Lösung (10 g/L) zugeben und die Mischung für 15 h inkubiert. Danach wurde das Material mehrfach mit PBS gewaschen.

Zur Immobilisierung von Proteinen auf den Trägern Fractogel® EMD Epoxy und Tresyl Toyopearl® wurde die BSA-Lösung (20 g/L BSA) für die Kopplung an Fractogel® EMD Epoxy 1:1 mit 0,1 M Carbonatpuffer, 0,15 M NaCl (pH 9,6) verdünnt, für die Immobilisierung auf Tresyl-Toyopearl® 1:1 mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung, 0,5 M NaCl (pH 8). Jeweils 35 µL der entsprechenden Proteinlösungen wurden zur Immobilisierung verwendet. Die Inkubationszeit für Fractogel® EMD-Epoxy betrug 42 h, für Tresyl-Toyopearl® 4 h. Danach wurden die Trägermaterialien mit PBS gewaschen, mit 200 µL 0,1 M Tris blockiert und abschließend dreimal mit PBS gewaschen.

### **5.7.5 Totalhydrolyse in der Mikrowelle**

Die Hydrolysen wurden alternativ zur klassischen Hydrolyse im Hydrolyseröhrchen in der Mikrowelle Discovery mit einer Protein-Hydrolyse-Einheit (Firma CEM) durchgeführt. Der Einsatz in dem Reaktionsgefäß der CEM-Mikrowelle wurde modifiziert, um eine gleichmäßigere Energie- und Wärmeverteilung der Proben zu gewährleisten (Kap. 8.2.5). In einem Arbeitsschritt können bei Verwendung der Mikrowelle bis zu fünf Proben in 1,5 mL-HPLC-Gläschen gleichzeitig hydrolysiert werden. In jedem Reaktionsgefäß (1,5 mL-HPLC-Gläschen) wurden 200 µL 6 M HCl vorgelegt. Anschließend wurden 20 µL der zu untersuchenden Proteinlösung und 5 µL der internen Standardlösung zugegeben. 10 mL destilliertes Wasser wurden in das Reaktionsgefäß gefüllt, sodass die Proben (225 µL) in den Probenfläschchen vollständig in das Wasserbad eintauchten. Durch Rühren des Wassers in der Gefäßkammer mit einem Magnetrührstab wurde ein schneller Temperatenausgleich gewährleistet. Die Verfahrensparameter wurden wie folgt gewählt: Standard, 50 W maximale Leistung, 150°C Höchsttemperatur, 10 min Laufzeit, 20 min Haltezeit, 6,9 bar Maximaldruck, Rühren: "hi". Die Temperaturmessung erfolgte über Faseroptik. Bevor die Hydrolyse gestartet wurde, wurde das Reaktionsgefäß evakuiert und dreimal mit Stickstoff gespült (1,1 bar). In dieser Stickstoffatmosphäre wurde die Hydrolyse gestartet. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, bis zur Trockene evaporiert (ca. 2 h bei 60°C) und anschließend in 200 µL Reinstwasser aufgenommen. Die Proben wurden mittels HPLC analysiert.

## **5.8 Methoden zur Reinigung der TNT-Seren**

Zur Herstellung der TNT-Affinitätssäule müssen die Antikörper aus dem Serum isoliert werden. Dies erfolgte zunächst klassisch mittels Protein-A-Reinigung. Diese Reinigung führte jedoch zu keinen befriedigenden Ergebnissen, sodass eine Strategie zur Isolierung spezifischer anti-TNT-Antikörper entwickelt wurde (Kap. 9).

### **5.8.1 Protein-A-Reinigung**

#### **Protein-A-Säule**

Für die Protein-A-Säule wurde eine 60 x 4 mm ID Leersäule mit einem Volumen von 754 mL verwendet (CS Chromatographie Service, Art. Nr. 424004). Als Trägermaterial wurde Fractogel® EMD-Epoxy (M) 40-90 µm genutzt an das das rekombinante Protein A (BioVision 6500-25 No. 51100)

mittels der Epoxy-Methode gekoppelt wurde. Zur Konditionierung wurde zunächst mit 5 mL Methanol, dann mit 50% Methanol und abschließend mit 7 mL Carbonatpuffer (30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 70 mM NaHCO<sub>3</sub>, 145 mM NaCl, pH 9,6) gespült. Zur Immobilisierung wurde die Stammlösung rProtein A auf 15 mg/mL verdünnt (560 µL Carbonatpuffer und 240 µL Protein-A-Stammlösung). Aufgrund der mäßigen Reaktivität der Epoxygruppen wurde die Säule 42 h bei 32-34°C inkubiert. Anschließend wurde das Material mit Trispuffer (10 mM C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, pH 8,5) geblockt (Inkubationszeit 1-2 h). Wenn die Säule nicht direkt verwendet wurde, wurde sie mit 5 mL 0,1% NaN<sub>3</sub>-PBS-Pufferlösung gespült und im Kühlschrank gelagert. Vor der Verwendung musste sie mit PBS gespült werden.

Um die IgG-Fraktion zu gewinnen, wurde nach dem Serumaufrag mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1 M Glycinpuffer-HCl, pH 2,8 bzw. pH 2,2 eluiert. Die Fraktionen wurden direkt bei der Elution mit 5-fach konzentriertem Phosphatpuffer auf pH 7,6 abgepuffert, um einer Denaturierung der Antikörper vorzubeugen.

### Protein-A-Kit

Alternativ wurde ein Protein-A-Kit (NAb™ Protein A Plus Spin Kit, 0,2 mL) verwendet. Die Durchführung erfolgt gemäß der Anleitung des Kits [248]. Als Neutralisationspuffer wurde nicht das mitgelieferte Tris-Puffersystem sondern 5-fach konzentrierter PBS verwendet, da die Aminogruppen von Tris bei einer späteren Kopplung stören würden. Das Probenvolumen der aufgetragenen Seren betrug zwischen 300 und 500 µL.

### 5.8.2 Affinitätssäule mit TN6PHA-Liganden (Trisopor™)

Der Ligand wurde als aktivierter NHS-Ester verwendet (100 µL 6,7 mg/mL TN6PHA-NHS-Ester, M = 410,3 g/mol) und im ersten Schritt an Amino-Trisopor™ 1500 gekoppelt. Für das Gelingen der Kopplung im organischen Lösungsmittel ist die Deprotonierung der Aminogruppen notwendig. Hierzu wurde die organische Base Triethylamin verwendet, da diese aufgrund der sterischen Hinderung nicht sehr nukleophil ist. Es wurden fünf verschiedene Ligandendichten durch unterschiedliche Ansätze erzeugt. Bei jedem Ansatz wurde 40 mg des ausgeheizten Amino-Trisopor™ 1500 verwendet:

75 µL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung + 125 µL Dioxan + 10 µL Trimethylamin  $\triangleq$  5,831 µmol/mL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung

15 µL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung + 185 µL Dioxan + 10 µL Trimethylamin  $\triangleq$  1,167 µmol/mL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung

3 µL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung + 197 µL Dioxan + 10 µL Trimethylamin  $\triangleq$  0,233 µmol/mL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung

0,6 µL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung + 199,4 µL Dioxan + 10 µL Trimethylamin  $\triangleq$  0,0467 µmol/mL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung

0,12 µL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung + 199,9 µL Dioxan + 10 µL Trimethylamin  $\triangleq$  0,0093 µmol/mL TN6PHA-NHS-Ester-Lösung

Der Ansatz wurde unter Lichtausschluss 1,5 h bei 250 rpm auf einem Thermomixer bei RT geschüttelt. Das Trägermaterial wurde zweimal mit 100 µL und einmal mit 200 µL Dioxan gewaschen. Mit Bernsteinsäureanhydrid erfolgte die Blockierung der eventuell noch vorhandenen freien Aminogruppen in zwei Schritten: Jeweils 200 µL 200 mM Anhydridlösung (in Dioxan) wurden auf



die Ansätze gegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze zunächst mit Dioxan, am Ende mit Reinstwasser gewaschen.

### 5.8.3 Affinitätssäule (Sepharose™) mit 4-Nitrophenyl-Liganden

Im ersten Schritt erfolgte eine Veresterung von 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure zum NHS-Ester. NHS und DCC wurden jeweils in 1,4-Dioxan zusammen mit einer Spatelspitze DSC gelöst. DSC wurde zugegeben, um eventuelle Wasserspuren zu entfernen, die zu unerwünschten Hydrolyse führen könnten. Anschließend wurden die Komponenten im Verhältnis 1:1:1 miteinander nach der zuvor genannten Reihenfolge vermischt (jeweils 49 µmol). Der Ansatz wurde unter Lichtausschluss über Nacht bei 650 rpm auf einem Thermomixer bei RT geschüttelt. Infolge der Kopplung entstand ein Niederschlag, der durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 12000 g abgetrennt wurde. In dem klaren Überstand befindet sich der gelöste NHS-Ester. Zur Immobilisierung wurde zunächst die HiTrap™-Säule mit Isopropanol gewaschen, um eventuell vorhandene Konservierungsmittel zu entfernen. Für die Beschickung der Säule wurde eine 10 mL-Hamiltonspritze unter Verwendung einer Spritzenpumpe eingesetzt. Um das Ethylendiamin an die Säule zu koppeln, wurden 60 mL einer 1%-igen Ethylendiaminlösung (in Isopropanol) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Isopropanol gewaschen (acht Säulenvolumina). Der 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure-NHS-Ester wurde in einem dreifachen Überschuss zur ursprünglich vorhandenen NHS-Beladung (30 µmol gelöst in 2 mL Isopropanol) auf die Säule gebracht und für 60 min inkubiert. Die Säule wurde mit Isopropanol gewaschen und daraufhin schrittweise mit Wasser äquilibriert (80% Isopropanol; 50% Isopropanol; 20% Isopropanol; 100% H<sub>2</sub>O). Die Neutralität des Eluenten wurde mittels pH-Papier kontrolliert. Mit Bernsteinsäureanhydrid erfolgte die Blockierung der eventuell noch vorhandenen freien Aminogruppen in zwei Schritten: Jeweils 10 mg Bernsteinsäureanhydrid ( $\approx$  je 100 µmol) wurde in 7,5 mL 0,1 M Hydrogencarbonatlösung (pH 8,3) gelöst und unverzüglich auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit fünf Säulenvolumina PBS gewaschen, gefolgt von weiteren fünf Säulenvolumina PBS, 0,1% Natriumazid zur Lagerung im Kühlschrank.

### 5.8.4 Affinitätssäule (Sepharose™) mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden

Die Durchführung erfolgte analog zur vorherigen Herstellung der Affinitätssäule aus Kapitel 5.8.3. Die in 1,4-Dioxan gelösten Komponenten 2,4-Dinitrophenyllessigsäure, NHS und DCC wurden im Verhältnis 1:1:1 (jeweils 44 µmol) eingesetzt. 30 µmol des aktivierten Liganden wurden zu 2 mL Isopropanol gegeben und für die spätere Kopplung an die Säule bereitgestellt. Zuerst wurde der Spacer an die HiTrap™-Säule gekoppelt. Um die Säule nur zu 5% mit Dinitrophenylgruppen zu beladen, wurde eine 1%-ige Ethylendiamin/Ethanolamin (1:20)-Lösung hergestellt. Es wurden 13 mL dieser Lösung mit einer Flussrate von 0,1 mL/min über die Säule geschickt. Anschließend wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina Isopropanol gewaschen. Vor Säulenauftrag wurde zum aktivierten Liganden 50 µL 10 mmol/L NaHPO<sub>4</sub>, 10 mmol/L NaCl, pH 9,0 hinzugefügt, um den pH-Wert der Probe zu erhöhen. 1700 µL ( $\approx$  25,5 µmol) dieser "aktivierten Liganden-Lösung" wurden eingesetzt und mit einer Flussrate von 0,1 mL/min aufgetragen und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit Wasser äquilibriert und mit Bernsteinsäureanhydrid geblockt.

### 5.8.5 Chromatogramme der Affinitätssäulen

Für die Erstellung der Chromatogramme der HiTrap™-Säulen wurde jeweils 100 µL eines 1:10 verdünnten Serums (K2B12) mit der Spritzenpumpe auf die Säule aufgetragen (Flussrate: 2 µL/min). Für die Fraktionierung wurde eine Mikrotiterplatte mit BSA beschichtet (0,1%-ige BSA in PBS,

pH 7,6 über Nacht bei RT). Es folgten Waschschritte (dreimaliges Waschen mit dem MTP-Washer). 100  $\mu$ L sechsfach-konzentrierter PBS wurden zum Sammeln der Elutionsfraktionen (zur Neutralisation) in die Kavitäten vorgelegt. Jeweils 100  $\mu$ L Probe wurden manuell pro Kavität gesammelt (Fraktionierung nach Zeit: Wechsel der Kavitäten nach jeweils 30 sec; bei einer Flussrate von 0,4 mL/min; Gesamtvolumen pro Kavität: 200  $\mu$ L). Ein Aliquot von jeweils 10  $\mu$ L wurde entnommen und in 190  $\mu$ L PBS gegeben. Diese Probe wurde im TNT-ELISA eingesetzt (Inkubation des primären Antikörpers). Es wurde kein Analyt (TNT) zugesetzt, sodass das erzeugte Signal abhängig von der jeweiligen Konzentration des primären Antikörpers in den Fraktionen war.

Um die unspezifische Bindung zu testen, wurde analog der obigen Vorschrift PETN-Hyperimmunserum, Boost 3 verwendet. Zur Erstellung eines Chromatogramms wurde der PETN-ELISA mit dem Tracer PETN-POD verwendet (1:200000 Verdünnung).

### 5.8.6 PEG-Affinitätssäule (Trisopor™) mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden

500 mg des Diol-Trisopor™-Materials wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen (Diol-Ligandendichte 33,4  $\mu$ mol/g). Die Diolgruppen (16,7  $\mu$ mol) wurden mit Hilfe von Natriumperiodat durch oxidative Spaltung zu Aldehydgruppen umgesetzt. Um eine vollständige Reaktion zu garantieren, wurde ein 12-facher Überschuss eingesetzt ( $\approx$  200  $\mu$ mol). Die Reaktionszeit betrug 90 min bei RT unter regelmäßiger Durchmischung. Die Reaktion des Natriumperiodats wurde gestoppt, indem der Ansatz mit insgesamt 6 mL Reinstwasser gewaschen wurde. Die Waschritte erfolgten durch Zentrifugieren des Trisopor™-Materials bei 12000 g für jeweils 5 min mit anschließender Entfernung des Überstandes und Hinzufügen von Reinstwasser. Die so entstandenen Aldehydgruppen konnten mit Aminogruppen zu einer Schiff'schen Base reagieren. Es wurden PEG-Amin-Moleküle über deren Aminogruppe an das Material gekoppelt, die zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen von Proteinen dienen. Dafür wurde eine 1:50-Mischung aus H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>N-PEG-OH eingesetzt. PEG wurde in einem 10-fachen Überschuss zur Kapazität des Materials eingesetzt (167  $\mu$ mol). Da die verwendeten PEG-Moleküle jeweils ein Molekulargewicht von ca. 3000 g/mol aufweisen, wurden 0,01 g H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> und 0,49 g H<sub>2</sub>N-PEG-OH in Phosphatpuffer pH 7,6 gelöst. Der pH-Wert dieses Ansatzes wurde mit pH-Papier kontrolliert (zu Beginn pH 12) und mit Phosphorsäure neutralisiert (21 h bei 230 rpm bei RT geschüttelt). NaCNBH<sub>3</sub> wurde in einem 10-fachen Überschuss (11,7 mg  $\approx$  167  $\mu$ mol) zum Ansatz gegeben, sodass die Schiff'sche Base sich zu einer stabilen sekundären Aminbindung umsetzen konnte (2,5 h bei 800 rpm inkubieren). Eventuell noch vorhandene Aldehydgruppen wurden mit einer 15%-igen Ethanolaminlösung blockiert (45 min bei 800 rpm, RT). Anschließend wurde das Material mit 1,4-Dioxan gewaschen [132, 134]. Es wurde mit einem Aliquot des Materials weitergearbeitet (ca. 1/5 der Menge). Die noch freien Aminogruppen des H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> wurden im Folgenden für die Kopplung eines N-(2,4-Dinitrophenyl)-6-amino-capronsäure-N-succinimidylesters genutzt. Zum Ansatz wurde ein Überschuss dieser intensiv gelben Substanz (24  $\mu$ mol) und Triethylamin hinzugefügt. Um sicher zu stellen, dass der für die Kopplung im Überschuss eingesetzte N-(2,4-Dinitrophenyl)-6-amino-capronsäure-N-succinimidylester, komplett von der Säule entfernt wurde, wurde zum Abschluss das Material mehrfach mit PBS gewaschen und der Durchfluss spektroskopisch kontrolliert (keine Absorption bei 280 nm).

Um eine Affinitätssäule mit größerem Volumen zu erhalten, wurde diese Kopplung im größeren Maßstab mit der restlichen Menge des mit den PEG-modifizierten Trägermaterials (4/5 der Ausgangsmenge) analog durchgeführt.

### 5.8.7 Bestimmung der Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper

Zum Testen der Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper zu den Analyten 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure, sowie 2,4-Dinitrophenylelessigsäure wurden Stammlösungen in Methanol mit einer Konzentration von 1 g/L hergestellt. Diese wurden mit PBS, pH 7,6 verdünnt, sodass derselbe Konzentrationsbereich, wie bei der TNT-Kalibrierkurve abgedeckt wurde (0 - 1000 µg/L). Die Kurven des TNT-Kalibrierstandards sowie der Analyten wurden mit Hilfe des Programms Origin<sup>®</sup> gemäß der 4-Parameter-Logistik-Gleichung angepasst, wobei die 0,001 µg/L-Werte als maximale Absorptionswerte (A-Wert) herangezogen wurden. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine TNT-Standardkurve mitgeführt. Der D-Wert der Analyten wurde dem des Kalibrierstandards (TNT) gleichgesetzt, da bei den Kurven der Kreuzreaktanden keine untere Asymptote erreicht wurde und angenommen wurde, dass diese Kurven bei Erhöhung der Analytkonzentration ebenfalls auf den unteren Asymptotenwert des TNTs zulaufen würden. So konnten mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung die Testmittelpunkte bestimmt werden. Die Berechnung des Fehlers erfolgte, indem von den Triplikaten der Kreuzreaktanden jeweils eine separate Kurve erstellt wurde. Die Standardabweichung der berechneten Kreuzreaktivitäten wurde als Fehler angegeben.

### 5.8.8 Bestimmung der pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper

Für diesen Test wurde das K2B12-Serum zunächst 1:10 in PBS, pH 7,6 verdünnt. Jeweils 90 µL des zu testenden Puffers wurden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß pipettiert. Getestet wurde die pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper in sauren Glycin-HCl-Puffern (0,1 mol/L Glycin, 0,5 mol/L NaCl) mit den pH-Werten 2,0; 2,4 und 3,0 und in basischen 0,05 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffern mit pH-Werten von 10,0; 11,0 und 12,0. Jeweils 10 µL des 1:10 verdünnten K2B12-Serums wurden zum entsprechenden Ansatz (90 µL) gegeben und für 5 min, 15 min, 30 min bzw. 60 min inkubiert. Die Inkubationszeit wurde beendet, indem zu den sauren bzw. basischen Ansätzen jeweils 100 µL 6-fach PBS, pH 7,0 hinzugefügt und gemischt wurde. Unmittelbar im Anschluss wurde eine 1:750-Verdünnung in PBS, pH 7,6 (7 µL aus dem Ansatz plus 5243 µL PBS) hergestellt, sodass eine Endverdünnung von 1:150000 des K2B12-Serums erzielt wurde. In jeder Testreihe wurden drei Konditionen getestet und jeweils eine Referenz mitgeführt. Als Referenz diente ein Ansatz mit PBS, pH 7,6, der gleichbehandelt mitgeführt wurde. Da die Antikörper dieses Ansatzes stets pH-neutralen Verhältnissen ausgesetzt waren, wurde die Stabilität dieser Kondition als 100% gesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate in einem ELISA getestet. Es wurde jeweils eine TNT-Kalibrierkurve erstellt. Die Triplikate, die mit 0,001 µg/L TNT, 0,01 µg/L TNT und 0,1 µg/L TNT versetzt wurden (insgesamt neun Absorptionswerte für eine Kondition), wurden für die Kalkulation der Stabilität der Antikörper herangezogen.

$$Stabilität [\%] = \frac{A(Test)}{A_{MW}(pH\ 7,6)} \cdot 100$$

mit A: Einzelabsorptionswert bei x in µg/L TNT der zu testenden Kondition

A<sub>MW</sub>: Mittelwert von drei Absorptionswerten bei x in µg/L TNT des Referenzansatzes

Somit erhielt man neun prozentuale Stabilitätswerte für eine Kondition. Für die grafische Auswertung wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung (Darstellung als Fehlerbalken) berechnet.

## 5.9 Methoden zur Herstellung der TNT-Affinitätssäulen

Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung der TNT-Affinitätssäulen basierend auf Sepharose™, Cellufine™ und porösen Glas, sowie deren reversiblen und irreversiblen Elutionen (Auswertung in Kapitel 10).

### 5.9.1 TNT-Affinitätssäulen mit Protein-A-gereinigtem anti-TNT-IgG

#### TNT-Affinitätssäule: Sepharose™ als Trägermaterial

Eine Leersäule mit einem Füllvolumen von 64,8 µL wurde zunächst mit NHS-aktivierter Sepharose™ (in Isopropanollösung) gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit kalter 1 mM HCl-Lösung mit einem Fluss von 40 µL/min gespült und das entstandene Leervolumen mehrfach mit dem Säulenmaterial nachgefüllt. Für die Proteinlösung zur Immobilisierung wurden 300 µL Serum K1B9 (Reinigung mit Protein A) verwendet. Die IgG-Fraktion wurden im Centriprep™ Zentrifugalfilter (Cut-off 3 kDa) mit 14000 g bei 4°C zentrifugiert und aufkonzentriert (pro Konzentrationsschritt 25 min). Anschließend wurde dreimal 350 µL Hydrogencarbonatlösung auf das Konzentrat gegeben und aufkonzentriert, um die Lösung auf pH 8,3 umzupuffern. Der Innenfilter wurde umgedreht und 2 min bei 1000 g in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß entleert. Die Konzentration der IgG-Lösung wurde am UV/VIS-Spektrometer bei 280 nm gemessen (100 µL 11,1 mg/mL IgG). Diese Antikörperlösung wurde zur Immobilisierung verwendet.

#### TNT- Affinitätssäule: Cellufine™ als Trägermaterial

Eine Leersäule mit einem Füllvolumen von 64,8 µL wurde zunächst mit Formyl-Cellufine™ (in Essigsäure) gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit kaltem PBS gespült und das entstandene Leervolumen wurde mehrfach mit dem Säulenmaterial nachgefüllt. Es wurden 300 µL des TNT-Serums (Protein A gereinigt) aufkonzentriert und mit Hydrogencarbonatlösung (0,2 M plus 0,5 M NaCl) umgepuffert und die Konzentration mit der 280 nm-Methode bestimmt (2,65 mg/mL). Zum Beladen wurde die Säule mit 1 mL Kupplungspuffer gespült (per Hand mit einer Spritze, daher höherer Fluss als an der Lösungsmittelpumpe) und anschließend 100 µL der verdünnten anti-TNT-IgG Lösung (50 µL anti-TNT-IgG-Lösung (2,65 mg/mL), 50 µL Kopplungspuffer und 2,7 g NaCNBH<sub>3</sub>), auf die Säule mit einer Spritze injiziert. Die Säule wurde 1 h 45 min bei RT inkubiert) und anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen. Das Blocken erfolgte 3 h mit 0,1 M Tris (6,87 mg NaCNBH<sub>3</sub> in 600 µL Tris), pH 8,5 bei RT. Anschließend wurde die Säule mit 3 mL Reinstwasser, mit 2 mL Phosphatpuffer, mit 1 mL Acetatpuffer und nochmals mit 2 mL PBS gewaschen.

#### TNT-Affinitätssäule: Poröses Glas als Trägermaterial

Eine Leersäule mit einem Füllvolumen von 64,8 µL wurde zunächst trocken mit Amino-Trisopor™ 1500 gefüllt. Die Säule wurde mit 3 mL Wasser gewaschen und das entstandene Leervolumen mehrfach mit Säulenmaterial nachgefüllt. Anschließend wurde mit 4 mL 0,1 M PBS und 0,15 M NaCl, pH 7,2 gewaschen. Eine 12,5%-Glutaraldehydlösung (130 µL 25% Glutaraldehyd verdünnt mit 130 µL PBS) mit 15,8 mg NaCNBH<sub>3</sub> wurde injiziert. Die Säule wurde über Nacht bei RT inkubiert und anschließend mit 0,1 M PBS gewaschen. Zur Proteinimmobilisierung wurden in 65 µL anti-TNT-IgG-Lösung (11,7 mg/mL) 4 mg NaCNBH<sub>3</sub> gelöst und diese Lösung mit einer Spritze auf die Säule injiziert (Inkubation über Nacht bei 4°C). Anschließend wurde mit Phosphatpuffer gewaschen. Zum Blocken wurde 0,1 M Trispuffer mit NaCNBH<sub>3</sub> (200 µL Tris und 10 mg NaCNBH<sub>3</sub>), pH 8,5 verwendet und bei RT für 3 h inkubiert. Danach wurde mit 0,1 M PBS gewaschen. Um die

Säulen von unspezifisch gebundenen Teilchen zu reinigen, wurden die Säulen mehrmals mit den folgenden drei Lösungen gewaschen: 0,01 M Phosphorsäure, pH 2,25, PBS (Verdünnung 1:10) und 1% Tween® 20 in PBS (Verdünnung 1:5).

### 5.9.2 HPLC-Chromatogramm sowie entsprechender TNT-ELISA

Die TNT-Affinitätssäulen wurden mit TNT beladen und im Anschluss mit einem Fluss von 80 µL/min 15 min mit PBS (Verdünnung 1:10), pH 7,6 (ohne NaCl) gewaschen. Die Stufenelution erfolgte von der 15. bis zur 25. Minute mit 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,25. Anschließend wurde die Säule 15 min mit 1/10 PBS regeneriert (Fluss 80 µL/min). Die Trisopor™-Säule wurde bereits vor Anschluss an die HPLC mit PBS gewaschen.

Der Durchlauf wurde in 40 µL-Fractionen auf für den TNT-ELISA vorbereiteten Mikrotiterplatten (mit anti-TNT-Antikörper beschichtet) gesammelt und ausgewertet.

### 5.9.3 Saure versus thermische Elution

Es wurden Säulen (Füllvolumen 64,8 µL) mit folgenden TNT-Affinitätsmaterialien verwendet:

1. 40,0 mg Trisopor™ und 80 µL einer aufkonzentrierten IgG-Lösung (13,9 mg/mL) Protein-A-gereinigtes K1B9-Serum
2. 41,5 mg Trisopor™ und 70 µL einer aufkonzentrierten IgG-Lösung (23,3 mg/mL) Protein-A-gereinigtes K1B9-Serum
3. 176 mg Formyl-Cellufine™ (in Essigsäure) und 50 µL einer aufkonzentrierten IgG-Lösung (21 mg/mL) Protein-A-gereinigtes K2B12-Serum (plus 15 mg NaCNBH<sub>3</sub>)

Die Affinitätssäulen wurden mit PBS gespült und mit 70 µL 0,5 ng/µL TNT-Lösung in PBS überladen. Anschließend wurden sie für 5 min inkubiert. Danach wurden die Säule mit 1 mL PBS gespült (von Hand per Spritze).

Die saure Elution erfolgte mit 0,01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,26 auf die Trapsäule (Onyx™-Säule). Um TNT zu detektieren und zu quantifizieren, wurde anschließend die Trapsäule (Onyx™ Monolithic C18 Länge 50 mm, ID 2 mm; Porengröße 130 Å) mit einem Fluss von 1,3 mL/min mit einem LM-Gradienten eluiert. Als Laufmittel wurden Reinstwasser und MeOH verwendet. Zu Beginn war die Säule mit 5% MeOH äquilibriert und der Gradient stieg innerhalb von 2 min auf einen Gehalt von 95% MeOH. Diese Konzentration wurde für 1,5 min gehalten. Danach wurde innerhalb einer halben Minute wieder die Anfangskonzentration von 5% MeOH erreicht und die Säule 2 min mit dieser Konzentration äquilibriert.

Bei der thermischen Elution wurden die Antikörper denaturiert, indem die Säule für 10 min in ein heißes Wasserbad (> 80°C) gelegt wurde. Anschließend wurde die Säule in die Agilent-HPLC vor der Trapsäule (C18-Säule) eingesetzt und 5 min mit einem Fluss von 100 µL/min von der Affinitätssäule auf die Trapsäule eluiert. Danach wurde die Affinitätssäule ausgebaut und die monolithische Trapsäule mit hohem Fluss (1,3 mL/min) nach der oben beschriebenen TNT-Methode mit einem steilen Methanolgradienten eluiert.

### 5.9.4 Online-Elution durch Denaturierung mit Lösungsmittel

Die Denaturierung erfolgte durch 100% Methanol. Als analytische Trapsäule wurde die Säule Onyx™ Monolithic C18 Länge 50 mm, ID 2 mm; Porengröße 130 Å verwendet. Um eine Retention auf der C18-Säule während der Elution zu gewährleisten, wurde das Lösungsmittel nach Passieren der Säule mit Reinstwasser (Flussgeschwindigkeit 570 µL/min) 1:20 verdünnt. Die TNT-Detektion und Quantifizierung erfolgte durch Elution der analytischen Säule nach der in Tabelle 5.1 aufgeführten Methode.

*Tabelle 5.1: Vollständige Methode der TNT-Elution (Denaturierung durch 100% Lösungsmittel).*

Zeit [min]	Reinstwasser [%]	ACN [%]	MeOH [%]	Fluss [mL/min]	Ventil	Bemerkung
0	100	0	0	0,03	1→6	Entfernen von PBS (Anfang)
3	100	0	0	0,03		Entfernen von PBS (Ende)
3,01	0	0	100	0,03		Denaturierung der Affinitäts-säule plus Wasserzufluss
15	0	0	100	0,03		Denaturierung (Ende)
15,01	100	0	0	0,03		Spülung der HPLC-Kapillaren mit Wasser (Anfang)
20	100	0	0	0,03		Ende der Spülung (Ende)
20,01	95	5	0	0,03	1→2	Erhöhen des Flusses (Anfang)
20,5	95	5	0	0,5		Erhöhen des Flusses (Ende)
22	95	5	0	0,5		Flacher Gradient (Anfang)
26	55	45	0	0,5		Steilerer Gradient (Anfang)
27	5	95	0	0,5		Gradient (Ende)
29	5	95	0	0,5		Reinigung der C18-Säule
30	95	5	0	0,5		Äquilibrieren (Anfang)
32	95	5	0	0,5		Äquilibrieren

### 5.9.5 Thermische Online-Elution mit Säulenofen

Die Denaturierung erfolgte durch Erhitzen im eigens entwickelten Säulenofen, indem 20 min lang heißes Wasser (> 80°C) durch den in der BAM angefertigten Säulenofen gepumpt wurde (Konstruktionszeichnung siehe Anhang). Danach erfolgte die Abkühlung des Säulenofens mit jeweils 5-minütigem Umspülen, zuerst mit Eiswasser, anschließend mit Wasser (RT). Als analytische Trapsäule zur Detektion und Quantifikation wurde die Säule Onyx™ Monolithic C18 Länge 50 mm, ID 2 mm; Porengröße 130 Å verwendet. In den ersten Experimenten wurde die Elution nach der in Tabelle 5.2 angegebenen Methode durchgeführt, wobei noch ein manueller Wechsel der Säulen erfolgte.

*Tabelle 5.2: TNT-Elution nach thermischer Denaturierung.*

Zeit [min]	Reinstwasser [%]	ACN [%]	PBS [%]	Fluss [mL/min]	Bemerkung
0	95	5	0	0,03	Erhöhen des Flusses
0,5	95	5	0	1	Stabilisierung der Basislinie
2	95	5	0	1	Flacher Gradient (Anfang)
5	55	45	0	1	Steilerer Gradient (Ende)
6	5	95	0	1	Gradient (Ende)
7	5	95	0	1	Reinigung der C18-Säule
8	95	5	0	1	Äquilibrierung (Anfang)
10	95	5	0	1	Äquilibrierung

Die komplette thermische Online-Elutionsmethode mit Überführen des Säuleninhalts der zuvor mit PBS gespülten TNT-Affinitätssäule auf die analytische Säule ist in Tabelle 5.3 aufgeführt. Der Fluss wurde vor der thermische Denaturierung der Antikörper gestoppt (20-minütiges Erhitzen mit heißem Wasser ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) im schnell regulierbarem Säulenofen). Nach 10-minütigem Abkühlen (5 min mit Eiswasser und 5 min mit Wasser bei RT) wurde die Methode gestartet.

*Tabelle 5.3: Endgültige Methode der TNT-Elution (thermische Denaturierung).*

Zeit [min]	Reinstwasser [%]	ACN [%]	Fluss [mL/min]	Ventil	Bemerkung
0	95	5	0,1	1→2	Äquilibrieren und Start
0,5	95	5	0,1	1→6	Überführung der TNT-Moleküle von der Affinitätssäule auf die C18-Säule (Start)
2	95	5	0,1		Ende der Überführung
2,01	95	5	0,1	1→2	Umstellen der Pumpe auf C18-Säule und Erhöhen des Flusses (Anfang)
2,5	95	5	0,5		Erhöhen des Flusses (Ende)
3	95	5	0,5		ACN-Gradient (Anfang)
9	5	95	0,5		ACN-Gradient (Ende)
11	5	95	0,5		Reinigung der C18-Säule
12	95	5	0,5		Äquilibrierung der C18-Säule (Anfang)
20	95	5	0,5		Äquilibrierung der C18-Säule





## 6 Herstellung und Untersuchung der Antikörper gegen PETN

In diesem Kapitel werden die Synthese des PETN-Haptens sowie die Herstellung des Immunogens und des Tracers für den PETN-Immunoassay beschrieben (Kap. 1.3.2 und 1.3.3). Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze des entwickelten PETN-ELISAs (Kap. 2.1) werden ermittelt und die Entwicklung der durch Immunisierung eines Kaninchens gewonnenen polyklonalen Antikörper präsentiert. Abschließend werden die Ergebnisse bzgl. pH- und Lösungsmittelbeständigkeit der Antikörper des finalen Serums sowie deren Kreuzreaktivitäten zu relevanten und strukturähnlichen Stoffen aufgezeigt und diskutiert.

### 6.1 Aufbau und Synthese eines neuen PETN-Haptens

Um eine möglichst hohe Ähnlichkeit des Haptens zum Analyten zu erhalten, wurde nach dem Konzept des bioisosteren Ersatzes erstmalig eine Nitrogruppe durch einen Carbonatdiester ersetzt (Kap. 1.3.3). So wurde bei dem hochsymmetrischen PETN-Molekül lediglich das N-Atom der Nitrogruppe durch ein C-Atom ersetzt, um eine Kopplungsstelle zu schaffen. Der Vorteil ist einerseits, dass das dritte Sauerstoffatom der veränderten Nitrogruppe durch dieses Vorgehen erhalten bleibt und somit die geschaffene Gruppe sterisch der räumlichen Struktur der Nitrogruppe des Analyten entspricht. Zum anderen ragt das Hapten aufgrund des längeren Linkers gegenüber dem früher verwendeten Haptens stärker aus dem Proteinmolekül heraus, sodass die immunologische Zugänglichkeit verbessert wurde. Der erhöhte Syntheseaufwand gegenüber der bereits praktizierten Succinylierung führt zu einigen Strukturvorteilen. Abbildung 6.1 veranschaulicht die Strukturen des Analyten, des „alten“ Haptens und des neu synthetisierten.

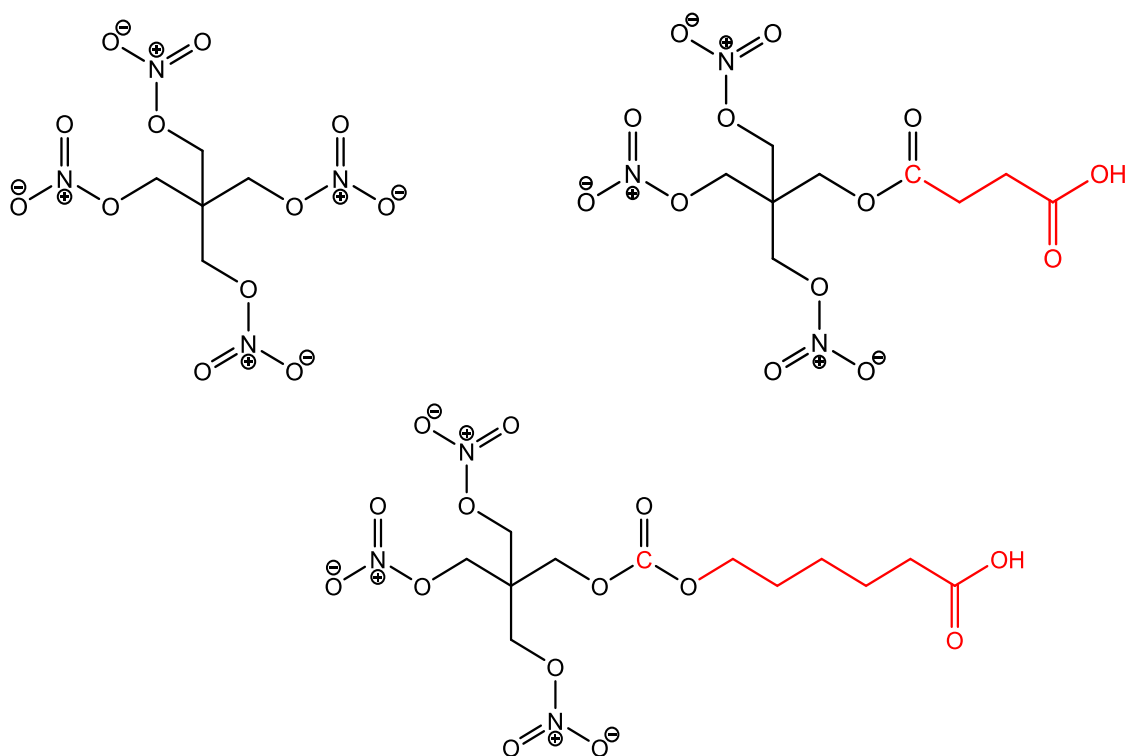


Abbildung 6.1: PETN (Zielanalyt), bekanntes Hapten durch traditionelle Succinylierung (oben), neues Hapten mit einer Carbonatdiester-Gruppe, bioisosterer Ersatz (unten), rot: strukturelle Unterschiede zum Analyten.

Die Synthese des nichtaktivierten Haptens wurde von M. Biyikal, BAM Fachbereich 1.9, ausgeführt und mittels hochauflösender Massenspektroskopie (MS) und Kernmagnetische Resonanz (NMR) verifiziert. Als Ausgangssubstanz zur Synthese wurde Pentaerythrit verwendet. Durch Nitrierung wurde im ersten Schritt Pentaerythrittrinitrat (PETriN) synthetisiert (Abb. 6.2).

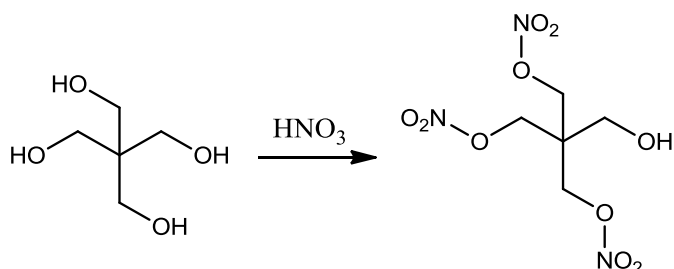


Abbildung 6.2: Reaktionsgleichung der Nitrierung von Pentaerythrit.

Die freie Hydroxylgruppe wurde durch Reaktion mit Carbonylimidazol (CDI) in trockenem Pyridin in das entsprechende Carbamat umgewandelt (Abb. 6.3).

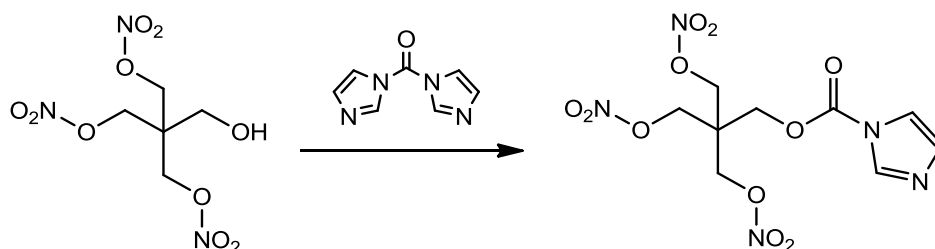


Abbildung 6.3: Reaktionsgleichung der Bildung des Carbamats aus dem Alkohol.

Anschließend wurde 1,6-Hexandiol als Linker gebunden (Abb. 6.4) [235, 236].

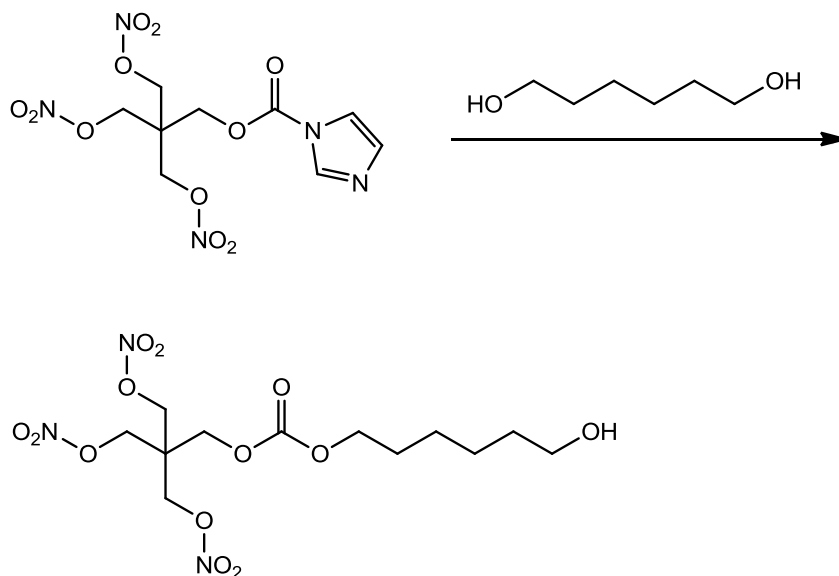


Abbildung 6.4: Reaktionsgleichung der Bindung des Linkers 1,6-Hexandiol.

Pentaerythritoltrinitrat-methyl-6-hydroxyhexylcarbonat ist ein farbloses Öl. Die Ausbeute für dieses Zwischenprodukt betrug 72%. Die Masse wurde mit hochauflösender MS mit 414,1002 m/z gemessen, die der theoretischen Masse exakt entspricht. Des Weiteren wurde dieser Stoff mittels NMR vermessen:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  (ppm): 1,26-1,30 (m, 4H), 1,36-1,42 (m, 2H), 1,54-1,61 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 4,08 (t, 2H,  $J = 10,2$  Hz), 4,24 (s, 2H), 4,29 (t, 1H,  $J = 7,8$  Hz), 4,66 (s, 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  (ppm): 26,0, 26,1, 29,1, 33,4, 42,4 (Cq), 61,6, 66,1, 69,2, 71,7, 155,0 (CO).

Im letzten Schritt der Haptensynthese wurde die endständige Hydroxylgruppe mit Pyridiniumdichromat (PDC) zu einer Carbonsäure oxidiert (Abb. 6.5) [237].

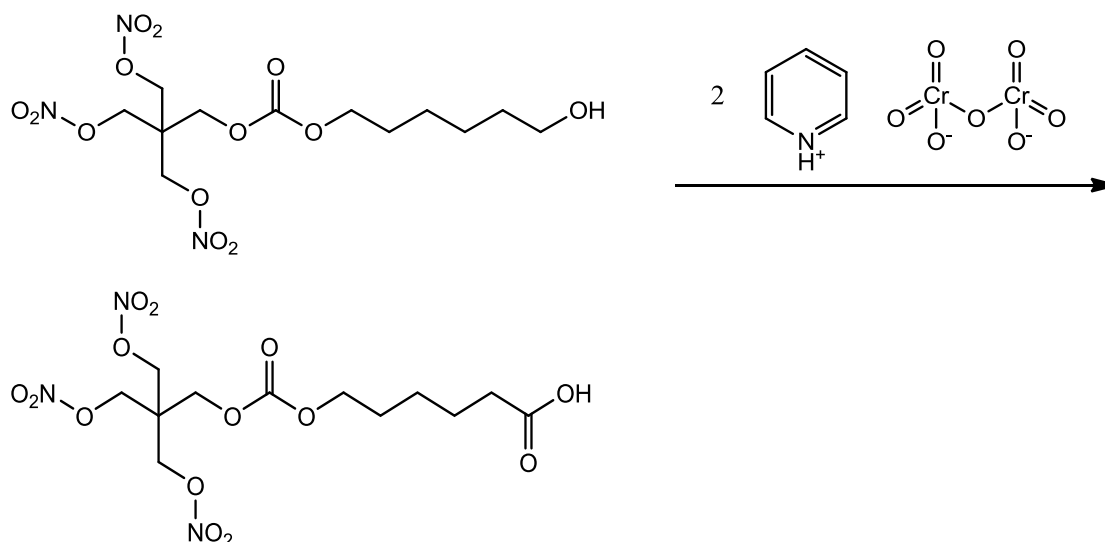


Abbildung 6.5: Reaktionsgleichung der Oxidation der Hydroxylgruppe zur Carbonsäure.

Das erhaltene Hapten ist ein farbloses Öl. Die Ausbeute dieses letzten Schritts betrug 73%. Die Masse wurde mit hochauflösender MS im negativen Mode mit 428,0811  $m/z$  gemessen und entspricht der theoretischen Masse (Theorie: 428,0789  $m/z$ ). In Abbildung 6.6 sind der Hauptpeak und die entsprechenden Isotopenpeaks zu sehen. Das Produkt kann ebenfalls im positiven Mode mit 430,0939  $m/z$  nachgewiesen werden.

PETN\_in\_Carbons\_1zu100\_negativ #813 RT: 14.28 AV: 1 NL: 1.17E6  
T: FTMS {1,1} - p ESI Full ms [150.00-700]

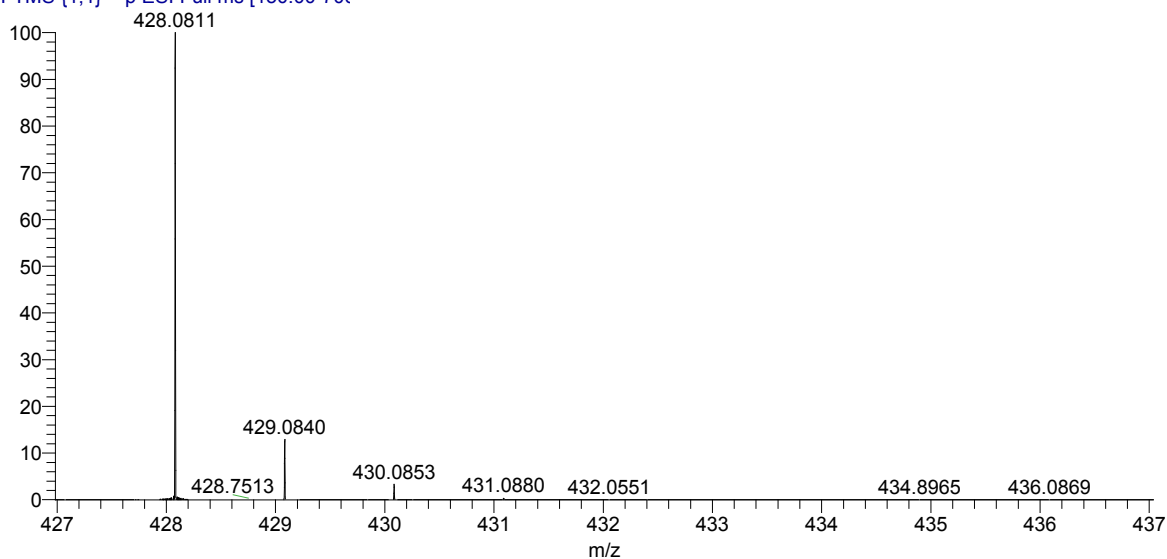


Abbildung 6.6: Hochauflösende MS-Messung (negativer Mode, nach HPLC-Trennung) des PETN-Haptens (5,5848 mg in 50  $\mu\text{L}$  Dioxan, 1 zu 100 verdünnt).

Die NMR-Messung des Endprodukts lieferte folgende Werte:

<sup>1</sup>H-NMR (d6-DMSO)  $\delta$  (ppm): 1,27-1,35 (m, 2H), 1,47-1,55 (m, 2H), 1,56-1,64 (m, 2H), 2,20 (t, 2H,  $J = 11,1$  Hz), 4,09 (t, 2H,  $J = 9,9$  Hz), 4,26 (s, 2H), 4,68 (s, 6H), 11,98 (s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (d6-DMSO)  $\delta$  (ppm): 25,5, 26,1, 29,2, 34,9, 42,8 (Cq), 66,5, 69,5, 72,1, 155,4 (CO), 175,8 (COOH).

## 6.2 Kopplung des Haptens an die Proteine BSA und POD

Zur Aktivierung der Carboxylgruppe wurde N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in trockenem Dioxan verwendet (Abb. 6.7) [37]. Der gebildete NHS-Ester wurde durch Zentrifugieren von dem als Nebenprodukt entstandenen Dicyclohexylharnstoff-Niederschlag abgetrennt und anschließend durch präparative HPLC gereinigt.

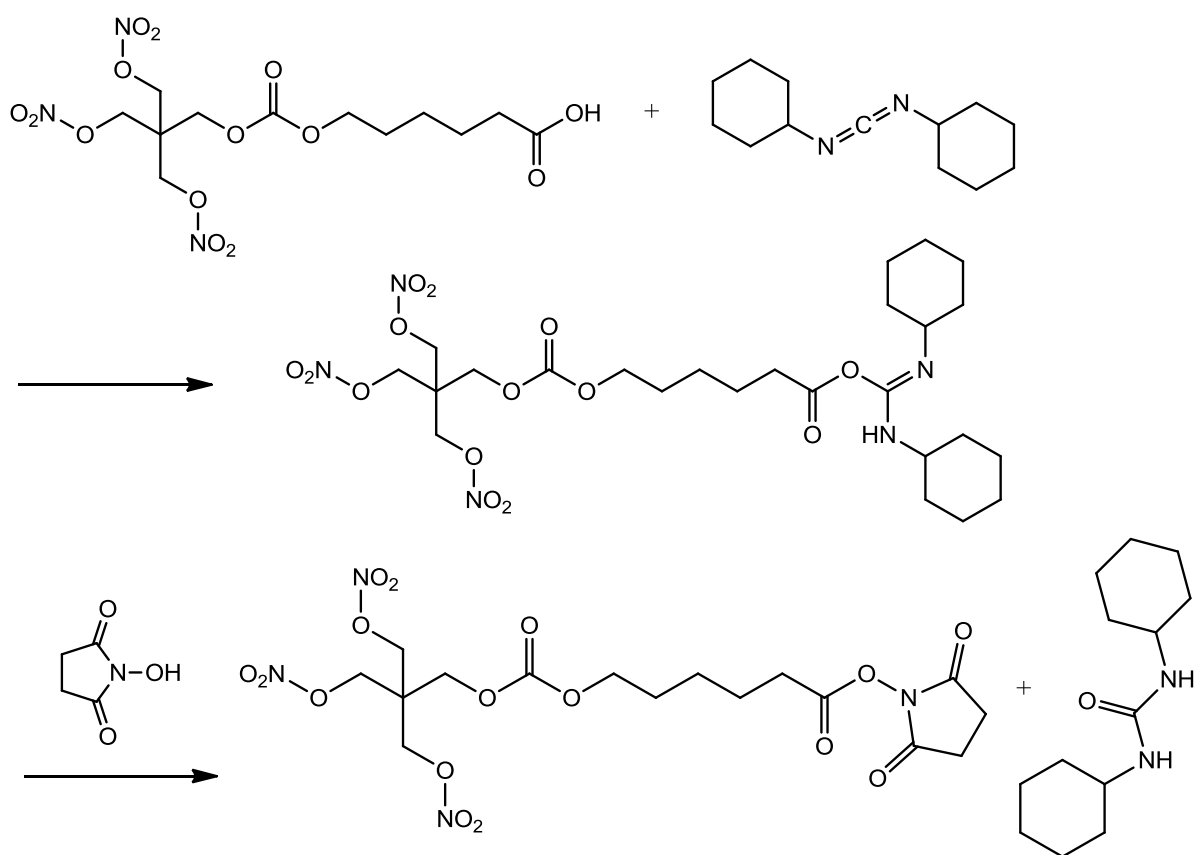


Abbildung 6.7: Reaktionsschema: Aktivierung der Carbonsäure zum NHS-Ester.

Der Syntheserfolg wurde mittels hochauflösender MS bestätigt (Abb. 6.8). Die im negativen Mode gemessene Masse von 525,0965 m/z entspricht der theoretischen Masse 525,09471 m/z.

PETN\_NHS\_Ester\_15pmol\_neg #857 RT: 13.55 AV: 1 NL: 1.31E4  
T: FTMS {1,1} - p ESI Full ms [100.00-800]

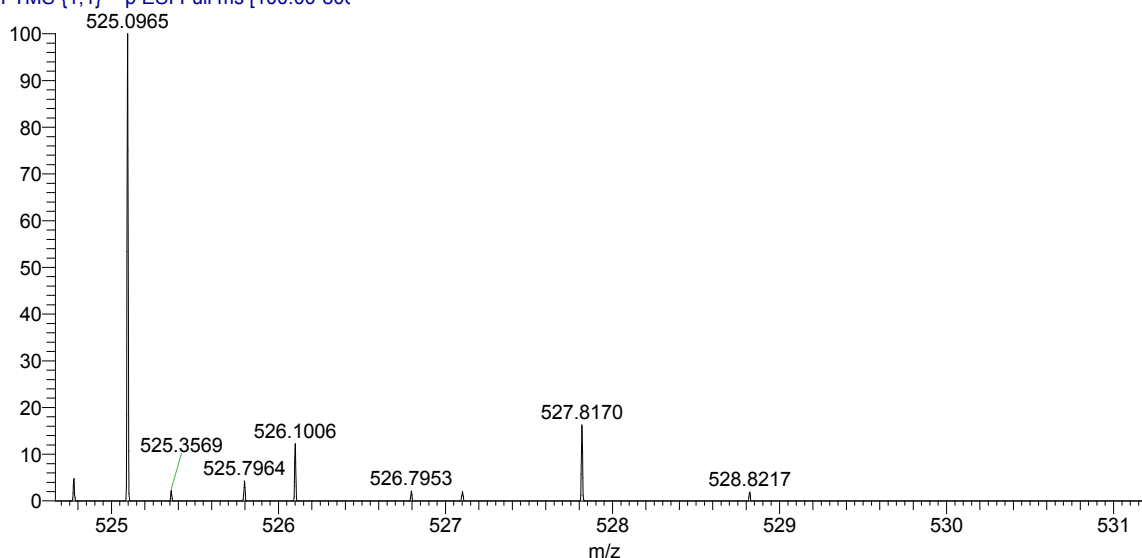


Abbildung 6.8: Hochauflösendes MS-Spektrum des NHS-aktivierten Haptens (negativer Mode).

In Abbildung 6.9 sind der Ausgangsstoff sowie die drei Zwischenprodukte der Synthese dargestellt.

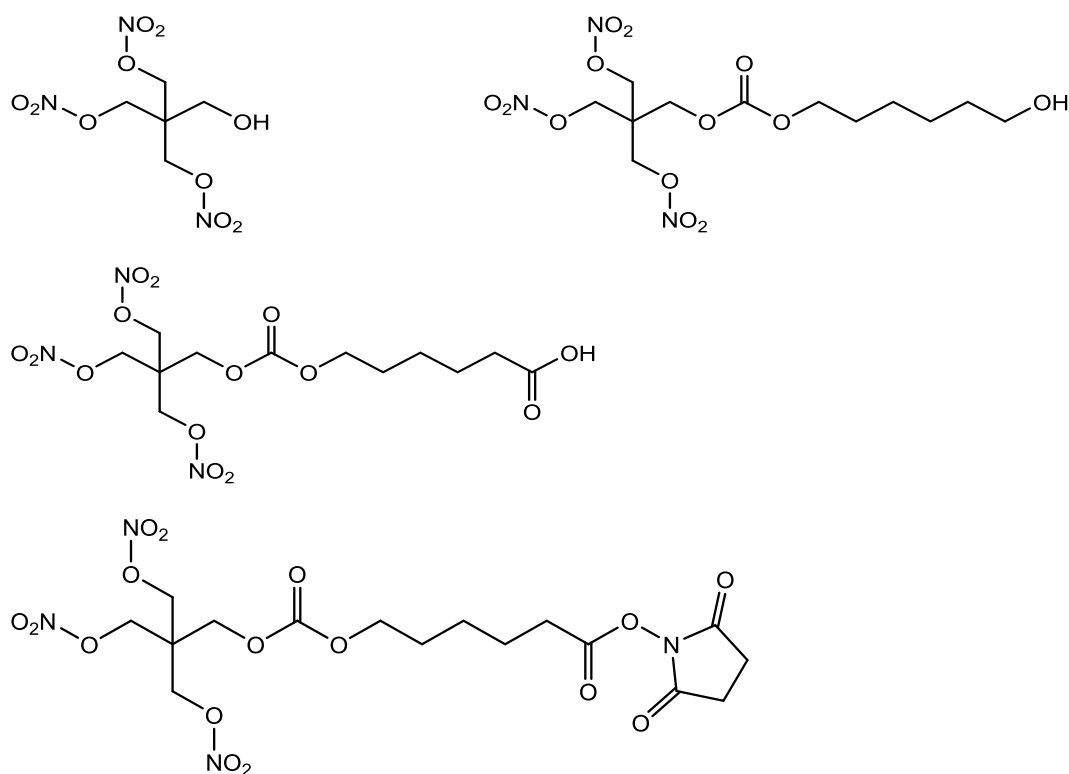


Abbildung 6.9: Ausgangsverbindung und Zwischenprodukte der Synthese des PETN-Haptens.

Die HPLC-Fraktion mit dem gelösten NHS-Ester wurde sofort für die Proteinkonjugation an BSA in einem leicht basischen Hydrogencarbonatpuffer, pH 8,1 verwendet, wobei unterschiedliche Volumina gewählt wurden (Tab. 6.1), um unterschiedliche Kopplungsdichten des Hapten-BSA-Konjugats zu erhalten. Bei dieser Kopplung reagieren primär die zugänglichen Aminogruppen der Lysinreste des BSA mit dem aktivierten Ester zu stabilen Amidbindungen (Abb. 6.10). Daher stehen nur 30 bis 35 der insgesamt 59 Lysin-Reste für die Reaktion zur Verfügung [249].

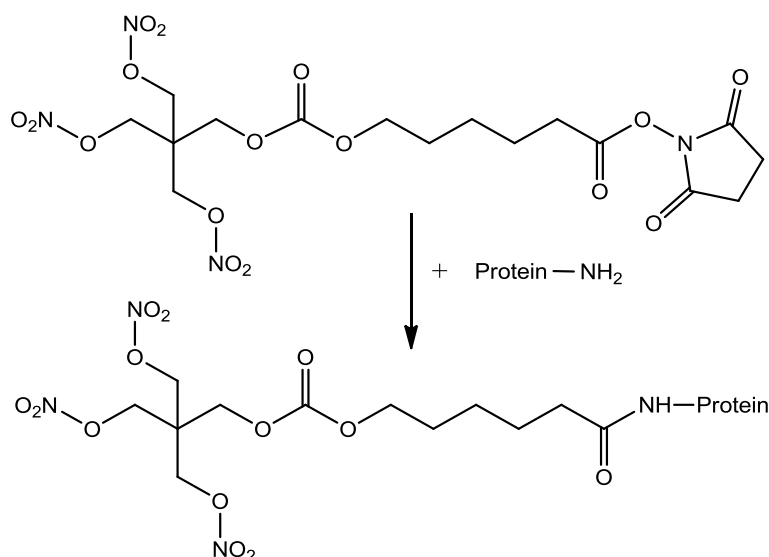


Abbildung 6.10: Reaktionsschema zur Amidbindung zwischen Protein und NHS-Ester.

Die unterschiedlich dicht gekoppelten Konjugate wurden durch Gelchromatographie (PD10-Säulen) gereinigt. Abbildung 6.11 zeigt exemplarisch die PD10-Elutionsprofile von drei BSA-Konjugaten.

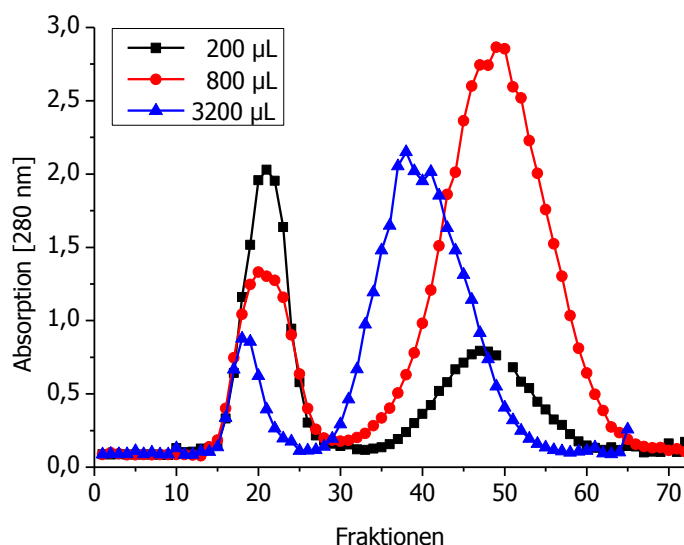


Abbildung 6.11: Elutionsprofile der Gelchromatographie der unterschiedlich dicht gekoppelten Hapten-BSA-Konjugate. Der vordere Peak markiert das Syntheseprodukt, der hintere das nicht umgesetzte Hapten. Die schwarze Linie beschreibt das Elutionsprofil des Produkts mit der geringsten Kopplung, das blaue das Profil der Verbindung mit der dichtesten Kopplung. Die Legende bezieht sich auf den Syntheseansatz (Volumen der zugegebenen NHS-Haptenlösung).

Die Kopplungsdichten geben an, wie viele Moleküle an einem Protein gekoppelt sind. Diese wurden mittels MALDI-TOF/MS-Messungen bestimmt (Abb. 6.12). Die Peaks der Konjugate sind im Vergleich zum reinen BSA sehr breit, da bei der Kopplungsreaktion stets ein Gemisch aus verschieden dicht gekoppelten Konjugaten entsteht. Je höher die Kopplung, desto breiter der Peak. Zur Charakterisierung wird der Kopplungswert beim Intensitätsmaximum verwendet.

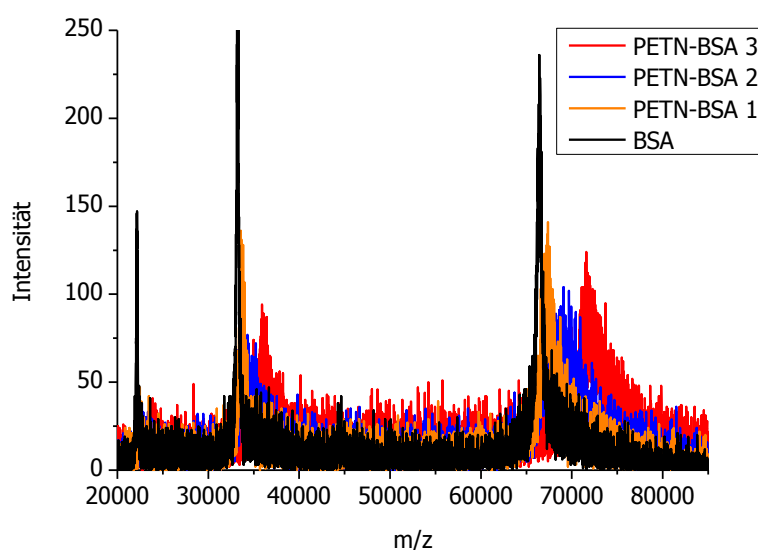


Abbildung 6.12: MALDI-TOF/MS von BSA (schwarz) und von den drei löslichen, unterschiedlich dicht gekoppelten Hapten-BSA-Konjugaten, Peakmaxima bei  $m/z = 66296$  (BSA),  $67478$  (PETN-BSA 1),  $68639$  (PETN-BSA 2) und  $72142$  (PETN-BSA 3).

Um den Proteingehalt abzuschätzen, wurden die Lösungen spektroskopisch mittels der 280 nm-Methode vermessen. Die eingesetzten Volumina der Haptenlösungen, deren Gesamtproteinmengen sowie deren Kopplungsdichten sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Volumen der für die Synthese eingesetzten Haptenlösung, Kopplungsdichte des Hapten-BSA-Konjugats sowie die Gesamtkonzentration des erhaltenen Produkts.

Syntheseinsatz PETN-NHS-Ester [ $\mu\text{L}$ ]	Name	Kopplungsdichte	gekoppelte Proteinmenge [mg]
200	PETN-BSA 1	2,9	2,3
400	PETN-BSA 2	5,7	2
800	PETN-BSA 3	14,2	1,8
1600	PETN-BSA 4	23,6*	0,1
3200	PETN-BSA 5	32,6**	0,1

\* Hapten-BSA-Konjugat ist nicht wasserlöslich, Messung aus dem ACN Waschwasser

\*\* Hapten-BSA-Konjugat ist nicht wasserlöslich, Messung aus dem Pellet

Für die Immunisierung wurde das lösliche BSA-Immunogen mit der höchsten Kopplungsdichte verwendet (PETN-BSA 3).

Um den für den zu entwickelnden PETN-ELISA notwendigen Tracer herzustellen, wurde das Hapten an Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt. Die Tracerkonjugate haben eine Kopplungsdichte von 0,48 (PETN-POD 1) bzw. 0,73 (PETN-POD 2) Molekülen pro POD (Abb. 6.13), wovon das höher gekoppelte für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA verwendet wurde. Das Enzym POD hat zwar sechs zugängliche Lysinreste, doch bisher sind keine Kopplungsdichten größer zwei in der Literatur dokumentiert [250, 251].

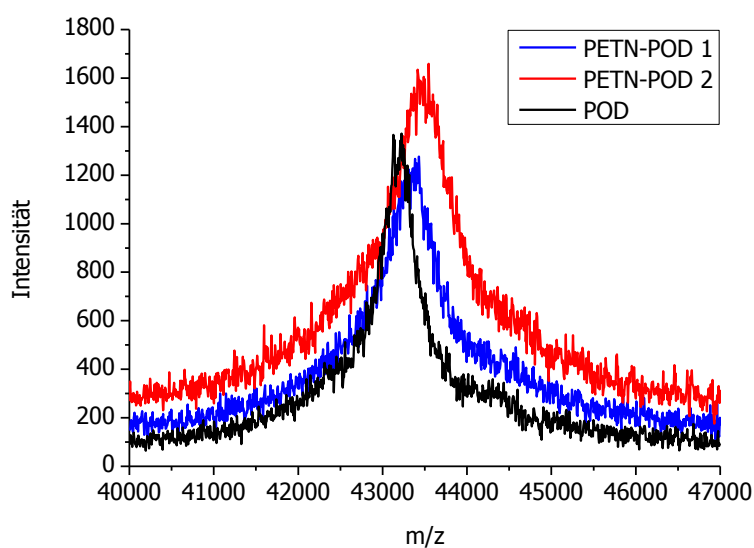


Abbildung 6.13: MALDI-TOF/MS von POD und den beiden synthetisierten Tracerkonjugaten, Peakmaxima bei  $m/z = 43186$  (POD),  $43487$  (PETN-POD 1) und  $43384$  (PETN-POD 2).

## 6.3 PETN-ELISA

### 6.3.1 Bestimmung von Testmittelpunkt und Affinitätskonstante

Um die Bindungskonstante bzw. Affinitätskonstante (Kap. 2.1.3) der polyklonalen anti-PETN-Antikörper zu bestimmen, wird folgendes Vorgehen gewählt: Das Serum sowie der Tracer werden mit der für den ELISA optimierten Konzentration aufgetragen. Anschließend werden beide Lösungen mit dem Faktor 1:1 verdünnt und die daraus resultierenden vier möglichen Kombinationen aus den Lösungen werden für den neuen PETN-ELISA auf einer Mikrotiterplatte verwendet, sodass vier Kalibrierkurven pro Platte verglichen werden (Abb. 6.14). Die Kurve mit dem kleinsten  $IC_{50}$ -Wert wird als neue Ausgangslösung für die neue Mikrotiterplatte verwendet und die beiden zugehörigen Serums- und Tracer-Lösungen erneut 1:1 verdünnt. Der  $IC_{50}$ -Wert sollte im Idealfall bei diesem Vorgehen konvergieren. Wenn das Signal zu schwach wird und der ELISA nicht mehr auswertbar ist, wird der bis dahin kleinste  $IC_{50}$ -Wert verwendet.

Der Fit der Kalibrierkurve des PETN-ELISAs, berechnet bei einer Serum- und Tracerverdünnung von jeweils 1:400000, ergibt einen Testmittelpunkt von  $0,293 \mu\text{g/L}$ . Eine weitere Verdünnung des POD-Tracers (1:800000) führte zu dem leicht verbesserten Testmittelpunkt von  $0,275 \mu\text{g/L}$ . Weitere Verdünnungen sind aufgrund der Signalstärke nicht möglich. Aus dem Testmittelpunkt berechnet sich nach der Formel (Kap. 2.1.2) die Affinitätskonstante  $2,26 \cdot 10^9 \text{ L/mol}$ .

$$K_A = 2 \cdot \frac{M}{IC_{50}}$$

Die Affinitätskonstanten der anderen Seren sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.



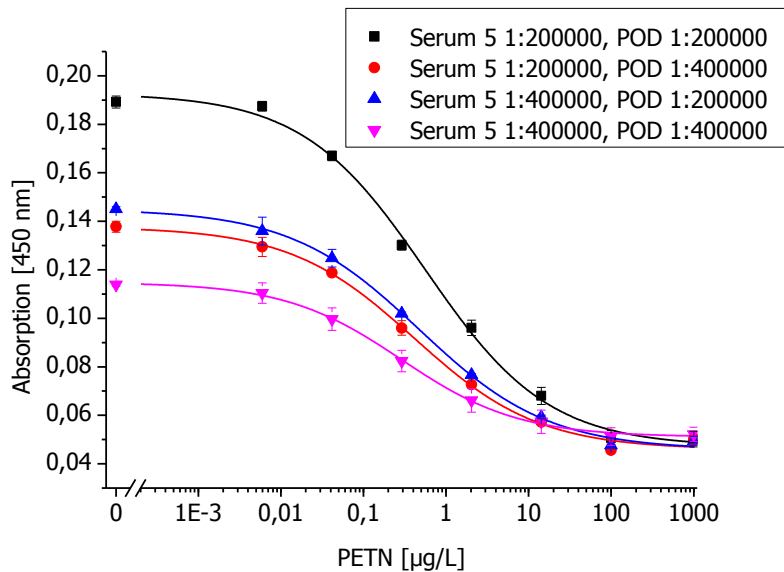


Abbildung 6.14: ELISA-Kurven von den Verdünnungen auf einer MTP zur Bestimmung der Bindungskonstante vom PETN-Hyperserum 5.

### 6.3.2 Entwicklung der anti-PETN-Antikörper im Laufe der Immunisierung

Die Charakterisierung der anti-PETN-Antikörper der Seren, die während des Immunisierungsprozesses getestet werden, wird standardmäßig durch ELISA-Protokolle dokumentiert [113]. Die Entwicklung wird in Abbildung 6.15 verdeutlicht. Nach einem Anstieg des Signals bei gleichen Verdünnungen von Seren und Tracer konnte beim Serum 3 das höchste Signal erzielt werden.

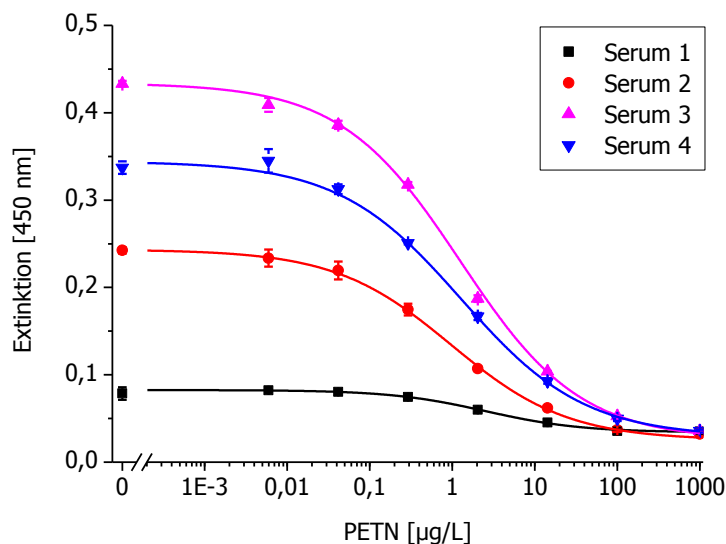


Abbildung 6.15: Sigmoidale Kalibrierungskurven der PETN-ELISAs von den PETN-Hyperseren 1-4.

Das Standardimmunisierungsprotokoll sieht eine Anfangsimmunisierung sowie drei weitere Boosts zur Antikörperproduktion vor (Serum 1). Um die Antikörperreife fortzuführen, wurde anschließend das Protokoll verlängert, indem dem Kaninchen nur noch die halbe Menge an Immunogen injiziert wurde und der Abstand der Boosts verlängert wurde. Der genaue Verlauf des Immunisierungsfortschritts ist in Tabelle 6.2 dokumentiert, ebenso die Entwicklung der Testmittelpunkte und die daraus berechneten Bindungsaffinitätskonstanten sowie die Serenstiter.

Tabelle 6.2: Immunisierungsprotokoll und Entwicklung der Antikörperaffinität und der Serentiter.

Serum #	-	-	-	1	2	3	4	5
Boost #	Prim.	1	2	3	4	5	6	7
Blutentnahme [Tage]	-	-	-	45	75	119	168	216
Injiziertes Immunogen [ $\mu\text{g}$ ]	100	100	100	100	50	50	50	50
$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	-	-	-	1,44	0,50	0,40	0,37	0,28
$K_A$ [ $10^9 \text{ L/mol}$ ]	-	-	-	0,44	1,27	1,58	1,71	2,26
Serumtiter*	-	-	-	0,081	0,242	0,430	0,347	0,309**

\* definiert als Maximum des Absorptionssignals

\*\* normierter Wert

Die Affinitätsreifung zeigte eine Steigerung innerhalb der ersten vier Monate. Danach sank der Serumtiter wieder leicht. Mit der Fortsetzung der Immunisierung nach dem Standardprotokoll konnte eine Steigerung des Serumtiters um Faktor 5,3 für das Serum 3, für das finale Serum eine Steigerung um Faktor 3,8 erreicht werden. Die Bindungskonstante stieg stetig an und verbesserte sich um das 5,7-fache und erreichte  $2,26 \cdot 10^9 \text{ L/mol}$  beim Serum 5. Dieses Serum, wovon ca. 20 mL zur Verfügung standen, wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

### 6.3.3 Kalibrierungskurven des PETN-ELISAs

Um die analytischen Größen Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und den Messbereich bzw. die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) des kompetitiven PETN-ELISAs zu ermitteln, werden zwei ELISA-Platten mit jeweils 32 PETN-Verdünnungen (Dreifachbestimmung) verwendet, die durch 1:1-Verdünnungen den Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^4 \mu\text{g/L}$  (Abb. 6.16) bzw. von  $10^{-4}$  bis  $10^5 \mu\text{g/L}$  abdecken (Abb. 6.17).

Die zweite Messung (Abb. 6.17) zeigt, wie empfindlich der ELISA ist. Hierbei wurde eine Pipette verwendet, die zuvor eine Mikrotiterplatte für einen klassischen PETN-ELISA mit den üblichen acht Konzentrationen gefüllt hat. Die "Verunreinigung" des Pipettenkolbens durch die zuvor verwendete konzentriertere Lösung führte zu Signalverfälschungen der schwach konzentrierten Lösungen im Bereich unterhalb von  $0,5 \mu\text{g/L}$  PETN, sodass der häufig auftretende Randeffect nur noch eine untergeordnete Bedeutung spielte. Durch diesen werden Konzentrationsdifferenzen zwischen gleichkonzentrierten Lösungen in innenliegenden und in am Rand befindlichen Kavitäten der Mikrotiterplatte hervorgerufen.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze und des Quantifizierungsbereich wird mit Hilfe des Präzisionsprofils von *Ekins* (Kapitel 2.1.2) festgelegt. Der relative Fehler berechnet sich nach der Formel:

$$\text{rel Fehler [\%]} = -100 \cdot \frac{\sigma_{\text{Extinktion}}}{B \cdot (D - A)} \cdot \left[ \left( \frac{C}{C_{\text{PETN}}} \right)^B + 2 + \left( \frac{C_{\text{PETN}}}{C} \right)^B \right]$$

Zusätzlich zu der Berechnung der realen relativen Fehler wurde eine Näherungskurve für eine Standardabweichung der Extinktionswerte von 2,5% erstellt (Abb. 6.16 und Abb. 6.17).

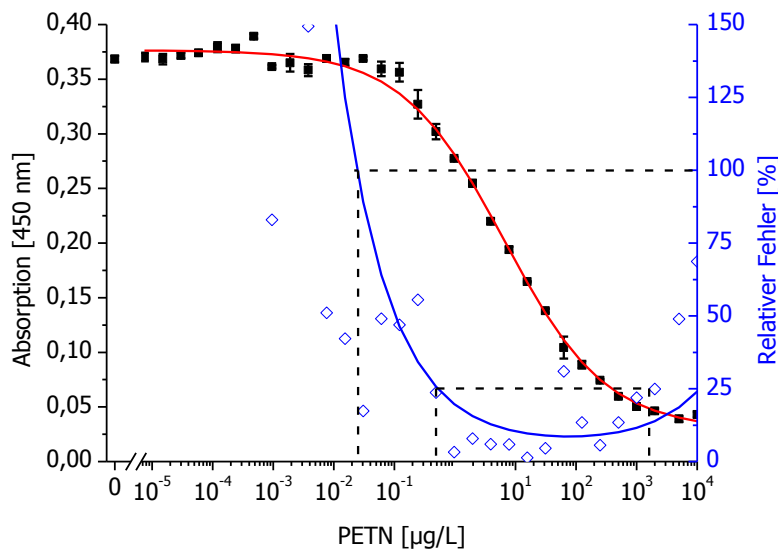


Abbildung 6.16: PETN-Kalibrierungskurven mit Fehlerbalken (Dreifachmessung) und zusätzlicher Näherungskurve (blau) für einen 2,5%-ige Fehler der Extinktion. Die Nachweisgrenze (DL) bei einem relativen Fehler von 100% liegt bei etwa 0,025 µg/L. Der Quantifizierungsbereich (relativer Fehler kleiner als 25%) erstreckt sich über den Konzentrationsbereich von 0,5 bis 1000 µg/L.

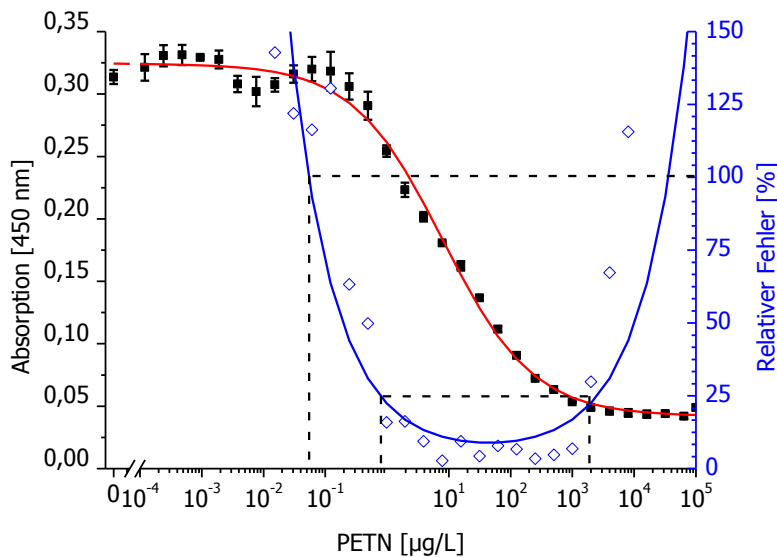


Abbildung 6.17: PETN-Kalibrierungskurven mit Fehlerbalken (Dreifachmessung) und zusätzlicher Näherungskurve (blau) für einen 2,5%-ige Fehler der Extinktion. Die Nachweisgrenze (DL) bei einem relativen Fehler von 100% liegt bei ca. 0,06 µg/L. Der Quantifizierungsbereich (relativer Fehler kleiner als 25%) erstreckt sich über den Konzentrationsbereich von 0,8 bis 2000 µg/L.

Es fällt auf, dass die Näherungskurve (Standardabweichung der Extinktionswerte von 2,5%) die realen Fehler bei kleinen Extinktionen nicht korrekt abbildet, da der prozentuale Fehler bei Messungen in diesem Bereich größer ist. Deshalb wird für die Abgrenzung des Messbereichs bei hohen Konzentrationen ein optischer Fit der Näherungskurve des relativen Fehlers vorgezogen. Der Messbereich wird bei dieser Methode so definiert, dass die Abweichung der Konzentrationsbestimmung unter 25% liegen muss. Die Nachweisgrenze (LOD) wird bei einem Fehler von 100% markiert.

Aus den Kurven der beiden individuellen Messreihen (Abb. 6.16 und 6.17) ergibt sich ein Messbereich von 0,5 bis 1000  $\mu\text{g/L}$  bzw. von 0,8 bis 2000  $\mu\text{g/L}$  PETN. Die Nachweisgrenze beginnt bei 0,025  $\mu\text{g/L}$  bzw. 0,06  $\mu\text{g/L}$  PETN. Somit kann für die Methode ein gesicherter dynamischer Arbeitsbereich von 1 bis 1000  $\mu\text{g/L}$  PETN angegeben werden (Abb. 6.18), d. h. die Quantifizierung erstreckt sich über mindestens drei Zehnerpotenzen. Die Detektion ist bereits ab einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{g/L}$  PETN möglich. Wenn eine erhöhte Präzision der Messwerte gefordert wird (Toleranzgrenze kleiner als 25% relativer Fehler), kann der Quantifizierungsbereich entsprechend den Bedürfnissen am Präzisionsdiagramm in Abbildung 6.18 abgelesen werden.

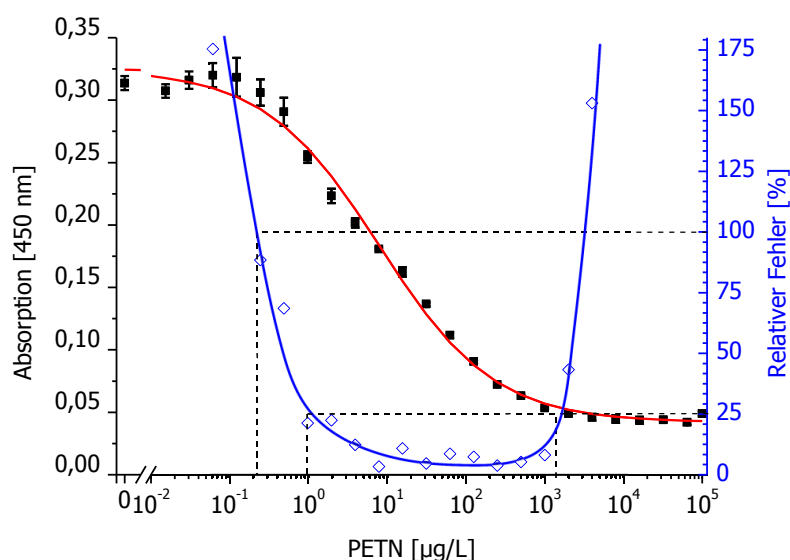


Abbildung 6.18: PETN-Kalibrierungskurven. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (drei Wiederholungen pro Konzentration). Die Nachweisgrenze (DL) bei einem 100% relativen Fehler liegt im Präzisionsprofil bei etwa 0,15  $\mu\text{g/L}$ . Der Messbereich (relativer Fehler kleiner als 25%) erstreckt sich über den Konzentrationsbereich von 1 bis 1000  $\mu\text{g/L}$ , was einem Dynamikbereich von drei Zehnerpotenzen entspricht.

Die Kalibrierungskurven zeigen, dass dieser Antikörper zu den empfindlichsten derzeit bekannten Immunoassays für PETN führt. Der Messbereich ist vergleichbar oder sogar leicht besser als instrumentelle Verfahren zum Nachweis von PETN [38].

## 6.4 pH- und Lösungsmittelverträglichkeit der anti-PETN-Antikörper

Die Stärke des Einflusses von Säuren, Basen, organischen Lösungsmitteln (MeOH und ACN) und von hohen Salzkonzentrationen auf die anti-PETN-Antikörper wurde in den folgenden Experimenten ermittelt. Zu diesem Zweck wurde das Serum 1:200 in PBS verdünnt. Danach erfolgte eine Verdünnung von 1:10 mit der jeweiligen zu testenden Lösung. Nach definierten Inkubationszeiten wurden die Lösungen 1:25 in PBS verdünnt, um wieder eine stabile PBS-gepufferte Lösung für den Assay zu erhalten. Im Anschluss wurden PETN-ELISAs mit den unterschiedlich behandelten Antikörperlösungen durchgeführt. Tabelle 6.3 gibt das Ergebnis bei Inkubation der Antikörper in Lösungen unterschiedlicher pH-Werte wieder. In Tabelle 6.4 wird der Einfluss des pH-Werts im zeitlichen Verlauf deutlich. Es wurden jeweils die A-Werte der bei den PETN-ELISAs erhaltenen Näherungen der Kalibrierkurven verwendet, wobei die Signale der ELISAs von unterschiedlichen Mikrotiterplatten durch Normierung auf PBS verglichen werden konnten.

*Tabelle 6.3: Signalintensität und deren Standardabweichung (n=4) der ELISA-Signale nach 60-minütiger Inkubation in Lösungen unterschiedlicher pH-Werte, Normierung der Intensität auf pH 7,6.*

pH-Wert	Signalintensität [%]
2	131 ± 8
2,4	136 ± 3
3	106 ± 3
7,6	100
10	101 ± 2
11	100 ± 2
12	94 ± 2

*Tabelle 6.4: Signalintensität des ELISA-Signals nach Säureeinwirkung (5, 15 und 60 min).*

pH-Wert	Signalintensität [%] nach 5 min	Signalintensität [%] nach 15 min	Signalintensität [%] nach 60 min
2	107	111	136
2,4	102	110	131
3	94	102	103
7,6	100	100	100

Unerwarteterweise konnte bei längerer Inkubationszeit des Serums in schwachen Säuren ein erhöhtes Signal im ELISA detektiert werden. Dieser Effekt wurde bei niedrigen pH-Werten am deutlichsten. Das legt eine mögliche Aggregation der Antikörper in saurem Milieu nahe. Beim ELISA bände so am anti-Kaninchenantikörper kein einzelner Antikörper, sondern ein Antikörperkonglomerat. Somit ständen dem Antigen mehr Bindungsstellen zur Verfügung. Als Nachweis für diese Hypothese könnte im Rahmen weiterführender Arbeiten die Größe des Proteins bzw. des Konglomerats in Lösung mittels Dynamische Lichtstreuung (DLS), Multi angle light scattering (MALS), Analytische Ultrazentrifugation (AUC) oder mittels Feldflussfraktionierung (FFF) nach Protein-A-Reinigung bzw. besser nach spezifischer anti-PETN-IgG-Reinigung bestimmt werden.

Ein ähnliches Phänomen war bei der Inkubation in lösungsmittelhaltigen Lösungen (mit ACN und MeOH) zu beobachten (Tab. 6.5 und 6.6). Die Denaturierung der Antikörper bei sehr hohem LM-Anteil führte jedoch zu einer Abschwächung des ELISA-Signals, was dem Signalerhöhungseffekt der möglichen Agglomeration entgegenwirkte. Ein maximaler Signalwert (Steigerung um 67%) wurde bei einer 60-minütigen Vorbehandlung mit 60% ACN erhalten. Mit MeOH und im sauren Milieu konnte lediglich eine 31%-ige Steigerung der Signalintensität erzielt werden (60 min Einwirkung mit 60% MeOH bzw. in einer sauren Lösung mit pH 2).

*Tabelle 6.5: Signalintensität und deren Standardabweichung (n=4) der ELISA-Signale nach 60-minütiger Inkubation in ACN-haltigen Lösungen, Normierung der Intensität auf 0% ACN.*

ACN [%]	Signalintensität [%]
0	100
10	98 ± 1
30	103 ± 1
40	144 ± 5
50	154 ± 7
60	167 ± 10
70	136 ± 7
80	20 ± 3

*Tabelle 6.6: Signalintensität und deren Standardabweichung (n=4) der ELISA-Signale nach 60-minütiger Inkubation in MeOH-haltigen Lösungen, Normierung der Intensität auf 0% MeOH.*

MeOH [%]	Signalintensität [%]
0	100
10	102 ± 1
30	104 ± 1
50	104 ± 1
60	131 ± 1
70	118 ± 1
80	100 ± 2

Die Inkubation der Antikörper in unterschiedlich konzentrierten NaCl-Lösungen zeigte im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu keinen Einfluss auf die Antikörperstabilität (Tabelle 6.7).

*Tabelle 6.7: Signalintensität der ELISA-Signale und deren Standardabweichung (n=4) nach 60-minütiger Inkubation in unterschiedlich konzentrierten NaCl-Lösungen, Normierung der Intensität auf 8,5 g/L NaCl.*

NaCl [g/L]	Signalintensität [%]
1	106 ± 6
8,5	100
10	105 ± 3
100	106 ± 2

Die Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper hohe Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln bei einstündiger Wirkdauer tolerieren (70% ACN bzw. 80% MeOH). Ein Lösungsmittelzusatz wirkt sich sogar begünstigend auf die Intensität des ELISA-Signals aus. Salzkonzentrationen von bis zu 100 g/L Natriumchlorid zeigen nahezu keine Auswirkung auf die Signalintensität beim anschließend durchgeführten ELISA. Auch eine 60-minütige Behandlung der Seren mit Säure (bis pH 2) oder Base (bis pH 12) führt nicht zu Signalverlusten, sondern teilweise zu Signalintensitätssteigerungen beim ELISA.

## 6.5 Kreuzreaktivitäten der anti-PETN-Antikörper

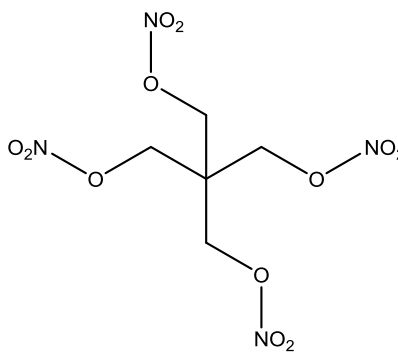
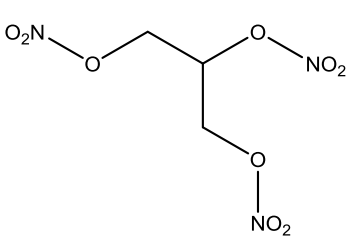
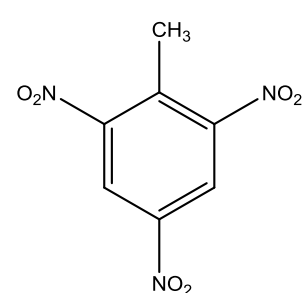
Um die Selektivität der anti-PETN-Antikörper zu überprüfen, wurden ebenfalls relevante oder strukturähnliche Stoffe getestet, ob diese am anti-PETN-Antikörper binden. Die Kreuzreaktivitäten (Kap. 2.1.4) der polyklonalen Antikörper wurden durch Testen einer wässrigen Verdünnungsreihe der jeweiligen Substanzen bestimmt. Hierbei wurde stets eine Vergleichsreihe von PETN auf der Mikrotiterplatte gemessen. Um die Kreuzreaktivitäten mit dem Wendepunktkonzentrationsverhältnis der Testsubstanz zu PETN bestimmen zu können, wurden die Parameter D aus der 4-Parametergleichung (Kap. 2.1.1) für die Testsubstanz auf den D-Wert des PETN-Fits festgesetzt. So wurde ein sigmoidaler Kurvenverlauf erzwungen.

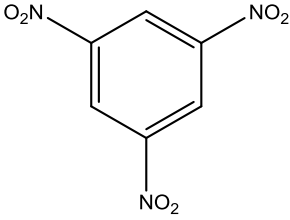
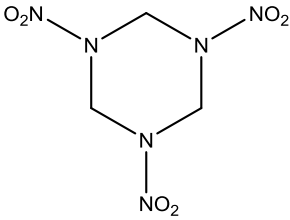
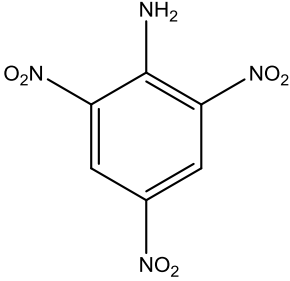
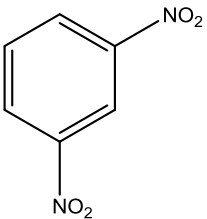
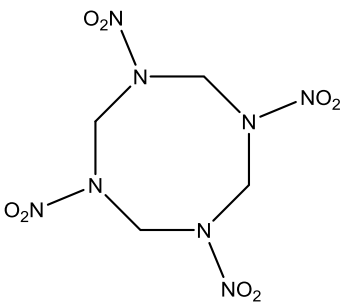
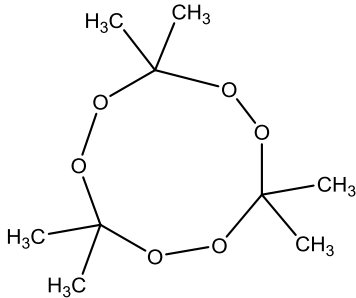
$$Extinktion = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{C_{PETN}}{C}\right)^B} + D$$

Aufgrund der Löslichkeit der Testsubstanzen ist oftmals eine Messung bei hohen Konzentrationen nicht möglich. Auch darf die Lösung keinen zu hohen LM-Anteil enthalten, da andernfalls das Enzym POD teilweise denaturiert, was verfälschte Ergebnisse zur Folge hätte. Bei sehr hohen Stoffkonzentrationen nimmt generell die unspezifische Bindung zu. Die Antikörper werden blockiert und es wird grundsätzlich kein gutes Ergebnis erzielt.

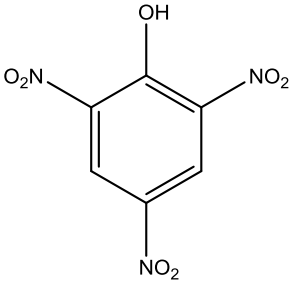
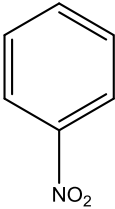
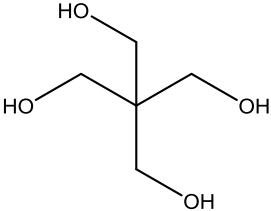
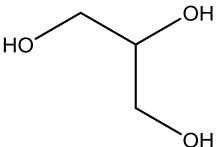
In Tabelle 6.8 sind die Kreuzreaktivitäten der polyklonalen anti-PETN-Antikörper (Serum 5) dargestellt. Nur das explosive Nitroglycerin, das strukturell dem PETN ähnelt, besitzt eine Kreuzreaktivität von etwa 0,1%. Für andere Sprengstoffe wie TNT, RDX und HMX wurden noch niedrigere Kreuzreaktivitäten gemessen. Verbindungen mit zwei oder drei Nitrogruppen zeigen ebenfalls nur sehr kleine Kreuzreaktivitäten. Bei TATP und Ammoniumnitrat konnten keine signifikanten Kreuzreaktivitäten gemessen werden. Für selektive Sprengstoffnachweise ist dies ein wichtiges, wenn auch zu erwartendes Ergebnis, da sich die Strukturen der Sprengstoffe deutlich unterscheiden und die Antikörper-Antigen-Bindung sehr selektiv ist, die mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip veranschaulicht werden kann. Alle anderen getesteten Verbindungen, auch Huminsäuren bis zu einer Konzentration von 100 mg/L, binden nicht am Antikörper. Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass die Kreuzreaktivitäten der getesteten Substanzen extrem niedrig sind, sodass sie für nahezu alle analytischen Anwendungen vernachlässigt werden können.

*Tabelle 6.8: Ermittelte Kreuzreaktivitäten der polyklonalen anti-PETN-Antikörper gegen häufig verwendete Sprengstoffe und strukturell verwandte Verbindungen.*

Substanz	Struktur	Kreuzreaktivität [%]
Pentaerythritoltetranitrat		100
Nitroglycerin		0,073
2,4,6-Trinitrotoluol, TNT		0,021

Substanz	Struktur	Kreuzreaktivität [%]
1,3,5-Trinitrobenzol		0,010
Hexogen, RDX		0,003
2,4,6-Trinitroanilin		0,003
1,3-Dinitrobenzol		0,003
Oktogen, HMX		0,002
Triacetontriperoxid, TATP		< 0,001



Substanz	Struktur	Kreuzreaktivität [%]
Ammoniumnitrat	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	< 0,001
2,4,6-Trinitrophenol		< 0,001
Nitrobenzol		< 0,001
Pentaerythritol		< 0,001
Glycerin		< 0,001
Natriumsalz der Huminsäure	-	< 0,001



## 7 Test der Trägermaterialien für die TNT-Affinitätssäule

Das für eine Affinitätssäule verwendete Material darf den Analyten nicht unspezifisch binden (Kap. 2.2.1). Daher wurden zunächst die Trägermaterialien auf unspezifische Bindung zu TNT untersucht und anschließend Strategien zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung getestet. Zum Abschluss werden die Partikelgröße und die Porengröße des auf diesem Weg gefundenen optimalen Trägermaterials vermessen.

### 7.1 Kapazitätsmessungen der unspezifischen TNT-Bindung

Um ein geeignetes Trägermaterial für eine TNT-Affinitätssäule zu finden, sollte das Material TNT nicht unspezifisch binden. Daher wurden Durchbruchkurven aufgenommen, indem eine verdünnte TNT-Lösung ( $3\text{ }\mu\text{g/L}$ ) durch die mit dem entsprechenden Trägermaterial gefüllte Säule geleitet wurde. Nach Passieren der Säule wurde der Durchfluss in mit anti-TNT-Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten getropft und mittels ELISA ausgewertet.

Zu Beginn wurde das synthetische Trägermaterial Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy (vernetztes Polymethacrylat mit Tentakel-Technologie) getestet. Im ersten Schritt wurden die funktionalisierten Epoxygruppen mit TRIS deaktiviert und in eine Leersäule gefüllt. Das unfunktionalisierte Trägermaterial sollte TNT nicht adsorbieren und die TNT-Konzentration des Säulendurchflusses sollte der Konzentration der Ausgangslösung entsprechen. Die durch unspezifische Bindung adsorbierte TNT-Menge lässt sich berechnen, indem die Differenz gebildet wird zwischen der Summe der TNT-Menge in jedem Well und der insgesamt durchgeleiteten TNT-Menge. Wird dieser Wert durch das Säulenvolumen dividiert, ergibt sich die unspezifische TNT-Bindungskapazität des Säulenmaterials.

Das unfunktionalisierte Trägermaterial Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy bindet TNT so stark unspezifisch, dass bis zum Ende des Versuchs die Konzentration des Durchlaufs nur bei etwa  $1/3$  der TNT-Konzentration der Ausgangslösung lag. An  $64,8\text{ }\mu\text{L}$  ( $\hat{=}$  Säulenvolumen) Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy wurden im Verlauf des Experiments  $7,49\text{ ng}$  TNT adsorbiert (Abb. 7.1).

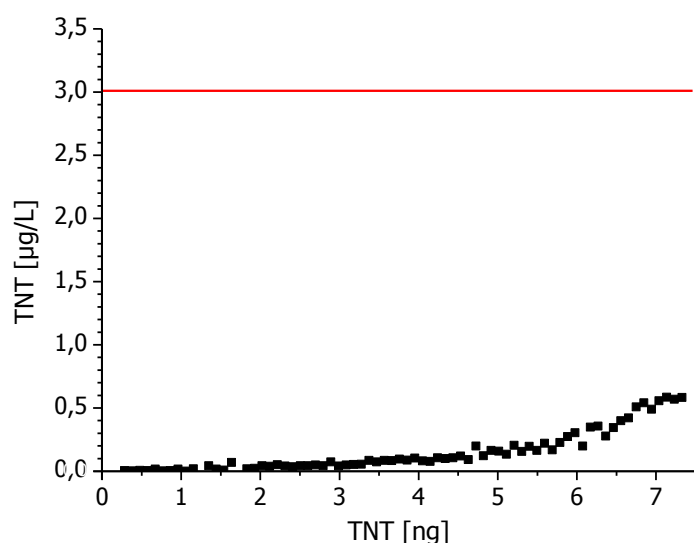


Abbildung 7.1: TNT-Durchbruchkurve des unfunktionalisierten Trägermaterials Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy (Säulenvolumen  $64,8\text{ }\mu\text{L}$ ) zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Bindung. Die rote Linie markiert die Konzentration der verwendeten TNT-Lösung.

## 7.2 Maßnahmen zur Unterdrückung der unspezifischen TNT-Bindung

Um die spezifische Bindung der Antikörper in den später herzustellenden Affinitätsäulen ausnutzen zu können, muss die unspezifische Bindung des Trägermaterials unterdrückt werden. Zunächst wurde untersucht, ob sich dies durch Lösungsmittelzusatz erreichen ließ. Die Unterdrückung der unspezifischen Bindung ist für eine spätere Anwendung nur zielführend, wenn die Antikörper unter den Bedingungen nicht denaturieren. Daher wurde Methanol als Lösungsmittelzusatz in Höhe von 5%, 10% und 20% verwendet. Der Lösungsmittelinfluss ist in Abbildung 7.2 deutlich zu erkennen. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Ein Zusatz von 5% MeOH verringert die Adsorption um 10%, ein Zusatz von 10% MeOH führt zu einer Minderung um 20% und bei einem Zusatz von 20% MeOH wird TNT zu 25% weniger unspezifisch gebunden.

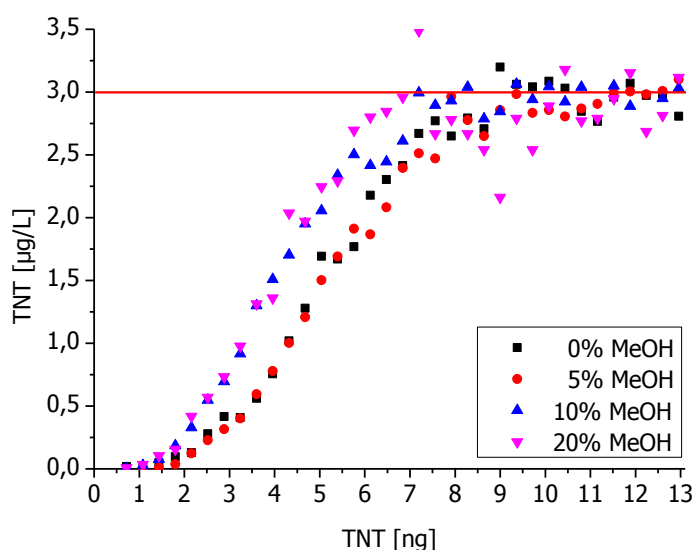


Abbildung 7.2: TNT-Durchbruchskurven des unfunktionalisierten Trägermaterials zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Kapazität von Fractogel® EMD-Epoxy (Säulenvolumen 16,2 µL) bei Verwendung von unterschiedlichen MeOH-Zusätzen (Fluss: 60 µL/min, ca. 120 µL wurden pro Kavität der MTP gesammelt). Die rote Linie kennzeichnet die Konzentration der verwendeten TNT-Lösung.

Tabelle 7.1: TNT-Bindungskapazitäten von Fractogel® EMD Epoxy.

Lösungsmittelzusatz	0% MeOH	5% MeOH	10% MeOH	20% MeOH
unspez. gebundenes TNT [ng]	4,95	4,49	3,95	3,73
unspez. TNT-Bindungskap. [µg] (pro mL Säulenvolumen)	0,305	0,277	0,244	0,230
Normierung	100%	90%	80%	75%

Da die Differenz zwischen der unspezifische TNT-Bindungskapazität bei Verwendung von 10% und 20% MeOH-Zusatz nur 5% beträgt, wird für einen weiteren Bindungsunterdrückungsversuch lediglich ein 10%-iger MeOH-Anteil verwendet, um einer partiellen Denaturierung der Antikörper vorzubeugen.

Zur weiteren Minimierung der unspezifischen Bindungen wird zusätzlich das Detergenz Tween® 20 verwendet, das sich beim ELISA in der Waschlösung zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen bewährt hat [114]. Deshalb wurden bei einem konstanten 10%-igen MeOH-Anteil unterschiedliche Tween®-Gehalte getestet. Es wurde eine stärker verdünnte TNT-Lösung (2,4 µg/L) verwendet. Um eine bessere Auflösung zu erhalten, wurden statt 120 µL nur 30 µL (2 Tropfen) pro

Kavität (Well) der MTP gesammelt. Abbildung 7.3 zeigt die deutliche Reduzierung der unspezifischen Bindung bei Zusatz von Tween® 20. Die aus dem Versuch resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 zusammengestellt.

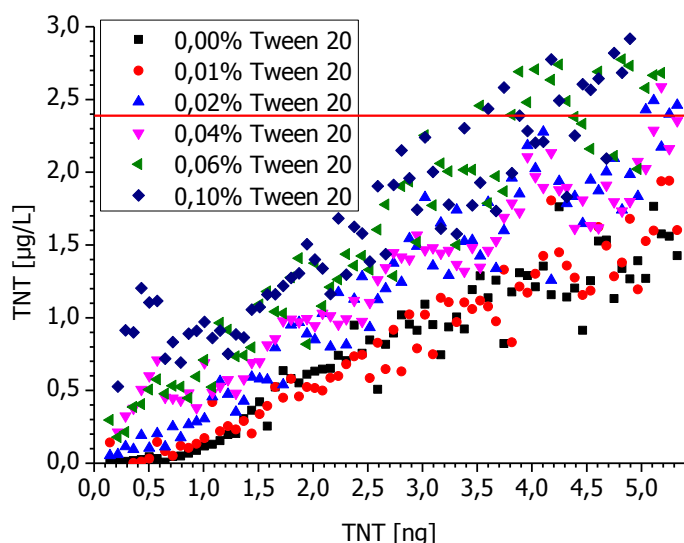


Abbildung 7.3: TNT-Durchbruchskurven des unfunktionalisierten Trägermaterials zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Bindung von Fractogel® EMD-Epoxy (Säulenvolumen 16,2 µL) bei Zusatz von 10% MeOH und unterschiedlichem Gehalt an Tween® 20. Die rote Linie kennzeichnet die Konzentration der verwendeten TNT-Lösung.

Tabelle 7.2: Unspezifische TNT-Bindungskapazitäten von Fractogel® EMD-Epoxy (Volumen 16,2 µL).

Tween® 20	0%	0,01%	0,02%	0,04%	0,06%	0,1%
TNT-Adsorption [ng]	> 3,61	> 3,53	2,67	2,54	1,90	1,60
TNT-Kapazität [µg] (pro mL Säulenvolumen)	> 0,223	> 0,218	0,165	0,157	0,117	0,099
Normierung	100%	> 89%	68%	64%	48%	41%

\* aus MeOH-Versuch

Die prozentualen Berechnungen in Tabelle 7.2 beziehen sich auf die im MeOH-Versuch (Tab. 7.1) berechnete unspezifische TNT-Bindungskapazität von 0,244 µg pro mL Trägermaterial mit 10% MeOH. Bei Verwendung von 0,1% Tween® reduziert sich die TNT-Adsorption auf 41%. Doch auch ein Material mit einer unspezifischen TNT-Bindungskapazität von ca. 0,1 µg TNT pro mL Matrix ist für eine Affinitätssäule nicht geeignet, die TNT im Spurenbereich analysieren soll.

### 7.3 Alternatives synthetisches Trägermaterialien: Toyopearl®

Um die Trägermaterialien Toyopearl®-AF-Tresyl (vernetztes Polymethacrylat, aktiviert mit Tresylgruppen) und Toyopearl® AF-Formyl (aktiviert mit Formylgruppen) zu testen, wurden die funktionellen Gruppen analog zum Fractogel® EMD-Epoxy-Trägermaterial mit TRIS geblockt. Die Durchbruchskurven der getesteten Trägermaterialien sind in Abbildung 7.4 dargestellt.

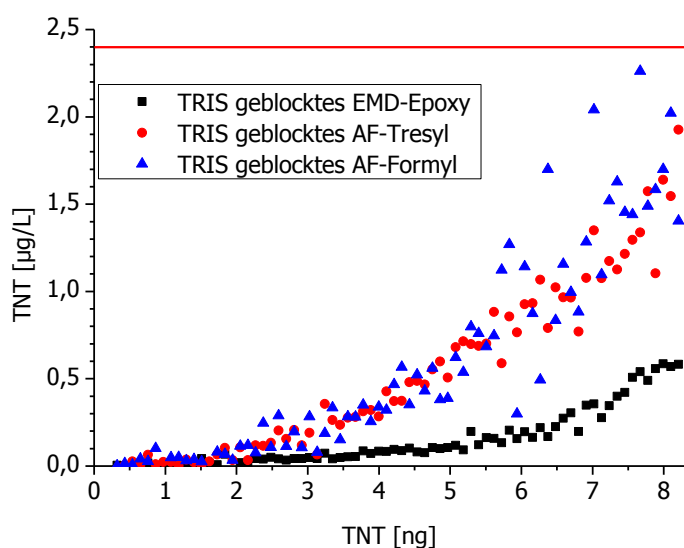


Abbildung 7.4: TNT-Durchbruchskurven der deaktivierten, synthetischen Trägermaterialien zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Auswertung mittels ELISA, 45 µL je Well, Säulenvolumen 64,8 µL). Die rote Linie kennzeichnet die Konzentration der verwendeten TNT-Lösung.

Die Kapazitätswerte, die sich aus diesen Versuchen ergeben, sind lediglich untere Grenzen, da die TNT-Anfangskonzentration auch hier nicht erreicht wurde. Sie sind in Tabelle 7.3 aufgeführt. Auch diese Materialien sind somit für eine TNT-Affinitätssäule aufgrund der hohen unspezifischen TNT-Bindung ungeeignet.

Tabelle 7.3: TNT-Bindungskapazitäten der untersuchten Trägermaterialien.

	EMD-Epoxy	AF-Tresyl	AF-Formyl
unspez. gebundenes TNT	> 7,494 ng	> 6,410 ng	> 5,990 ng
unspez. TNT-Bindungskapazität	> 0,116 µg/mL	> 0,099 µg/mL	> 0,092 µg/mL

Alle getesteten, synthetischen Materialien auf Basis von Polymethacrylat binden das kleine, recht hydrophobe Molekül TNT unspezifisch. Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy mit der Tentakeltechnologie führt zu deutlich höheren Adsorptionen im Vergleich zu den Toyopearl<sup>®</sup>-Materialien, was auf einen hydrophoberen Kern schließen lässt. Die Tentakeltechnologie, die die sterischen Hinderungen und die hydrophoben Wechselwirkungen bei Proteinimmobilisierungen abschwächen soll, kommt bei den kleinen TNT-Molekülen nicht zur Geltung.

## 7.4 Alternative Trägermaterialien zu synthetischen Polymethacrylaten

Alternativ wurden zwei naturstoffbasierte Trägermaterialien für eine mögliche TNT-Affinitätssäulanwendung getestet: NHS-aktivierte Sepharose<sup>™</sup> und Cellufine<sup>™</sup>-Formyl. Sepharose<sup>™</sup> ist ein Trägermaterial, das häufig in der Affinitätschromatographie verwendet wird. Die funktionellen Gruppen der Materialien wurden ebenfalls mit TRIS deaktiviert. Als weitere Option wurde poröses Glas als Trägermaterial untersucht (mit Aminogruppen als funktionelle Gruppen). Bei den Durchbruchexperimenten dieser Trägermaterialien ist die Anfangskonzentration der TNT-Lösung nach wenigen Tropfen erreicht (Abb. 7.5). Die ersten Tropfen entsprechen nicht der Anfangskonzentration, da die Säulen nicht trocken, sondern mit PBS gefüllt gelagert wurden, sodass Verdünnungseffekte auftraten. In Tabelle 7.4 sind die aus dem Experiment berechneten unspezifischen TNT-Bindungs-

kapazitäten aufgeführt. Die unspezifischen TNT-Bindungen dieser Materialien sind sehr gering, sodass sich alle drei Trägermaterialien für eine TNT-Affinitätssäule eignen. Aufgrund der Druckinstabilität der naturstoffbasierten Materialien Sepharose™ und Cellufine™ (druckstabil bis 1 bar) können diese für eine spätere HPLC-Anwendung jedoch nicht verwendet werden.

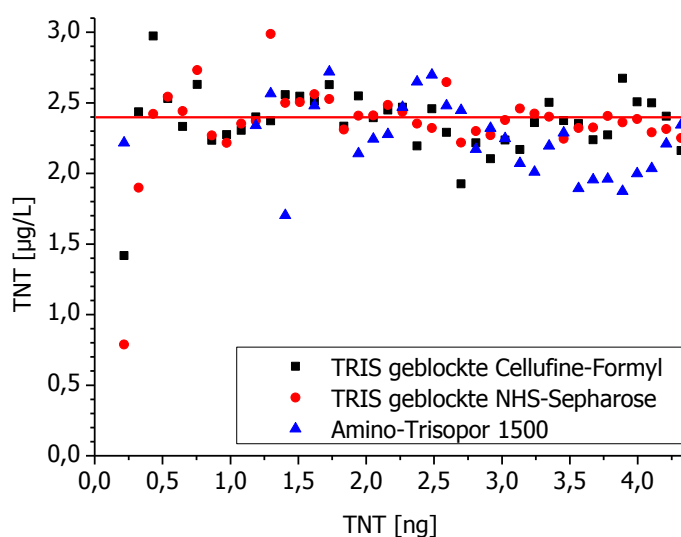


Abbildung 7.5: TNT-Durchbruchskurve von deaktivierter NHS-Sepharose™, deaktivierten Cellufine™-Formyl und von Amino-Trisopor™ 1500 (Fluss 300 µL/min; Fraktionsvolumen 45 µL (drei Tropfen), Säulenvolumen 64,8 µL). Die rote Linie kennzeichnet die Konzentration der verwendeten TNT-Lösung.

Tabelle 7.4: Unspezifische TNT-Bindungskapazitäten der naturstoffbasierten Trägermaterialien Toyopearl® AF Tresyl, Cellufine™-Formyl und von Amino-Trisopor™ 1500 an einer 64,8 µL-Säule bzw. bezogen auf 1 mL deaktivierten Säulenmaterial.

	Cellufine™-Formyl	NHS-Sepharose™	Trisopor™ 1500
unspez. gebundenes TNT an 64,8 µL	< 0,149 ng	< 0,173 ng	< 0,089 ng
unspez. TNT-Bindungskapazität pro mL Matrix	< 2,3 ng	< 2,7 ng	< 1,4 ng

Diese Untersuchungen zeigen, dass sich für die Herstellung von TNT-Affinitätssäulen poröses Glas (Trisopor™) als optimales Trägermaterial anbietet, da es zum einen TNT nicht unspezifisch bindet – im Gegensatz zu den synthetischen Polymeren – zum anderen eine hohe Druckbeständigkeit aufweist, die vor allem für den Einsatz an der HPLC erforderlich ist – im Gegensatz zu den naturstoffbasierten Gelen.

## 7.5 Untersuchungen der Partikel- und Porengröße des porösen Glases

Die Fließeigenschaften einer Matrix hängen stark von der Partikelgröße, der Partikelgrößenverteilung und der Steifigkeit ab. Daher sollte ein Optimum zwischen Strömungsrate und Kapazität gewählt werden. Eine enge Partikelgrößenverteilung ist nicht so kritisch für eine erfolgreiche Trennung auf Basis der Affinitätschromatographie wie bei klassischen HPLC-Techniken, da es sich bei den meisten Biointeraktionen nicht um einen dynamischen Sorptions-Desorptions-Prozess handelt, sondern um einen einmaligen Bindungsprozess mit anschließender Elution. Die Partikelgröße sollte jedoch bei der Wahl des Trägermaterials nicht gänzlich vernachlässigt werden, da eine engere Teilchengrößenverteilung eine stabilere Packung ermöglicht und somit eine auf Dauer druckstabilere Säule liefert [134].

Für diese Arbeit standen zwei poröse Gläser zur Verfügung, die sich in Partikel- und Porengröße unterschieden, deren Kenngrößen in Tabelle 7.5 aufgeführt sind (Werte nach Herstellerangaben).

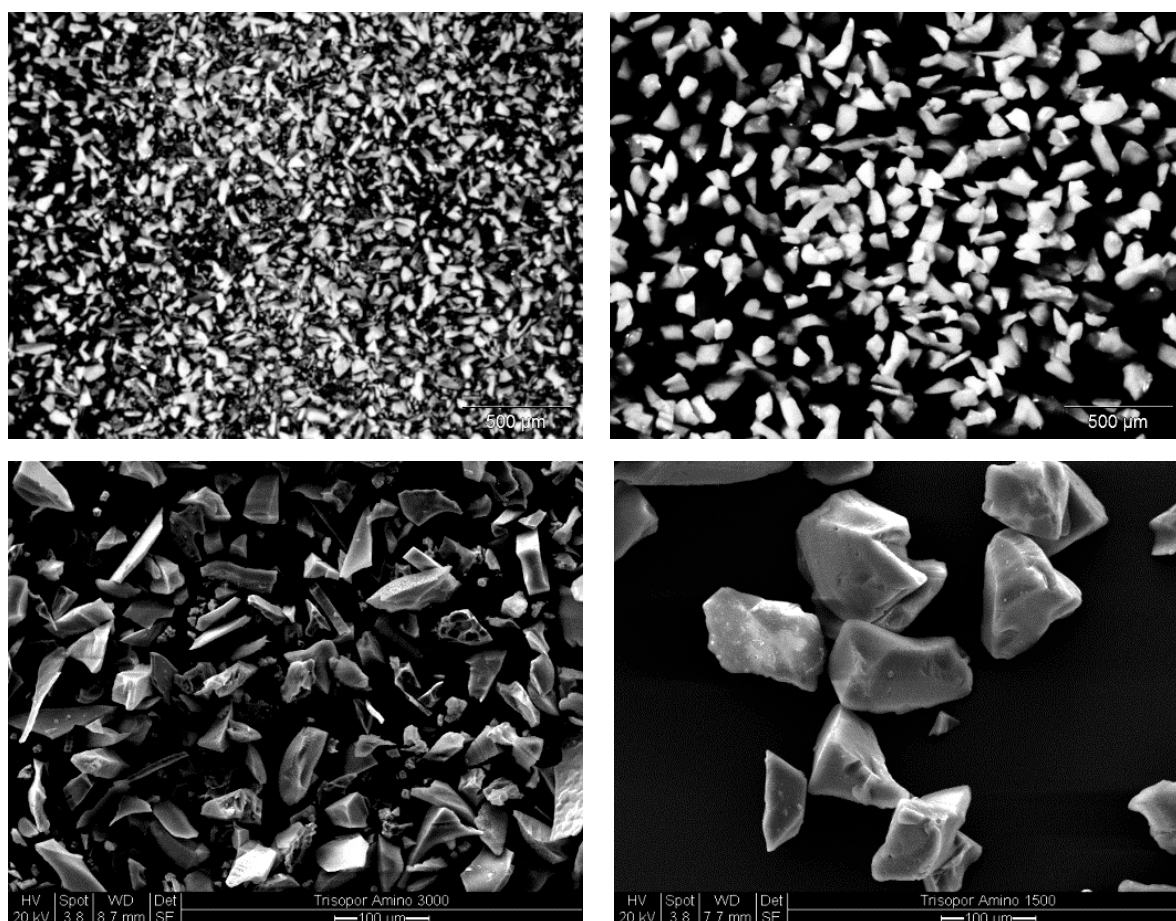
*Tabelle 7.5: Kenngrößen von Amino-Trisopor™ 1500 und Amino-Trisopor™ 3000.*

	Amino-Trisopor™ 1500	Amino-Trisopor™ 3000
Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ]	50-100	20-50
Porengröße [nm]	140-160 ( $\varnothing$ 152,1)	250-350 ( $\varnothing$ 321,82)
Porenvolumen [ $\text{mm}^3/\text{g}$ ]	1379,63	891,44
Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	40,63	12,79
Ligandendichte [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]	243,56	95,26

Um die Korn- und Porengröße dieser Trägermaterialien zu überprüfen, wurden die Trägermaterialien mit dem Lichtmikroskop und mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) vermessen. Zusätzlich wurde die Porengröße mittels Stickstoffadsorption und Hg-Porosimetrie bestimmt.

### 7.5.1 Lichtmikroskop- und Rasterelektronenmikroskopaufnahmen

Auf den Aufnahmen des Lichtmikroskops (Abb. 7.6, Referenzbalken 500  $\mu\text{m}$  bzw. 100  $\mu\text{m}$ ) wird die sehr unterschiedliche Partikelgrößenverteilung von Amino-Trisopor™ 3000 deutlich.



*Abbildung 7.6: REM-Aufnahmen von Amino-Trisopor™ 3000 (links) und Amino-Trisopor™ 1500 (rechts). Der Referenzbalken für die oberen Bilder beträgt 500  $\mu\text{m}$ , für die unteren 100  $\mu\text{m}$ .*



Auch die Formen der Partikel sind recht unterschiedlich. So sind kompaktere Formen, viele Plättchen und sehr viele kleine Bruchstücke zu erkennen. Die Maße reichen von 5 bis 100  $\mu\text{m}$ . Die Probe scheint nach unten keine Größenbegrenzung zu haben, da viele Partikel auch kleiner als 20  $\mu\text{m}$  sind. Ein solches Erscheinungsbild ist für die letzte (feinste) Charge eines Siebungsprozesses typisch. Die Angabe der Partikelgröße des Hersteller von 20-50  $\mu\text{m}$  ist somit nicht korrekt angegeben.

Die Partikelform des Amino-Trisopor™ 1500 ist deutlich homogener als die des 3000-er Materials. Die Aufnahme bestätigt die Herstellerangabe der Partikelgröße von 50 bis 100  $\mu\text{m}$  des 1500-Materials.

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops kann die Porenstruktur nach Bedampfen der Gläser mit Gold sichtbar gemacht werden. Die Porengrößen beider Materialien scheinen recht homogen zu sein, wobei die Größen aufgrund der Perspektive nicht immer exakt zu bestimmen sind (Abb. 7.7, Referenzbalken 2  $\mu\text{m}$  bzw. 1  $\mu\text{m}$ ). Die REM-Aufnahmen der Trisopor™-Materialien sind innerhalb einer Reihe in Abbildung 7.7 mit derselben Vergrößerung aufgenommen, sodass die unterschiedliche Porengröße der beiden Materialien gut zu erkennen ist.

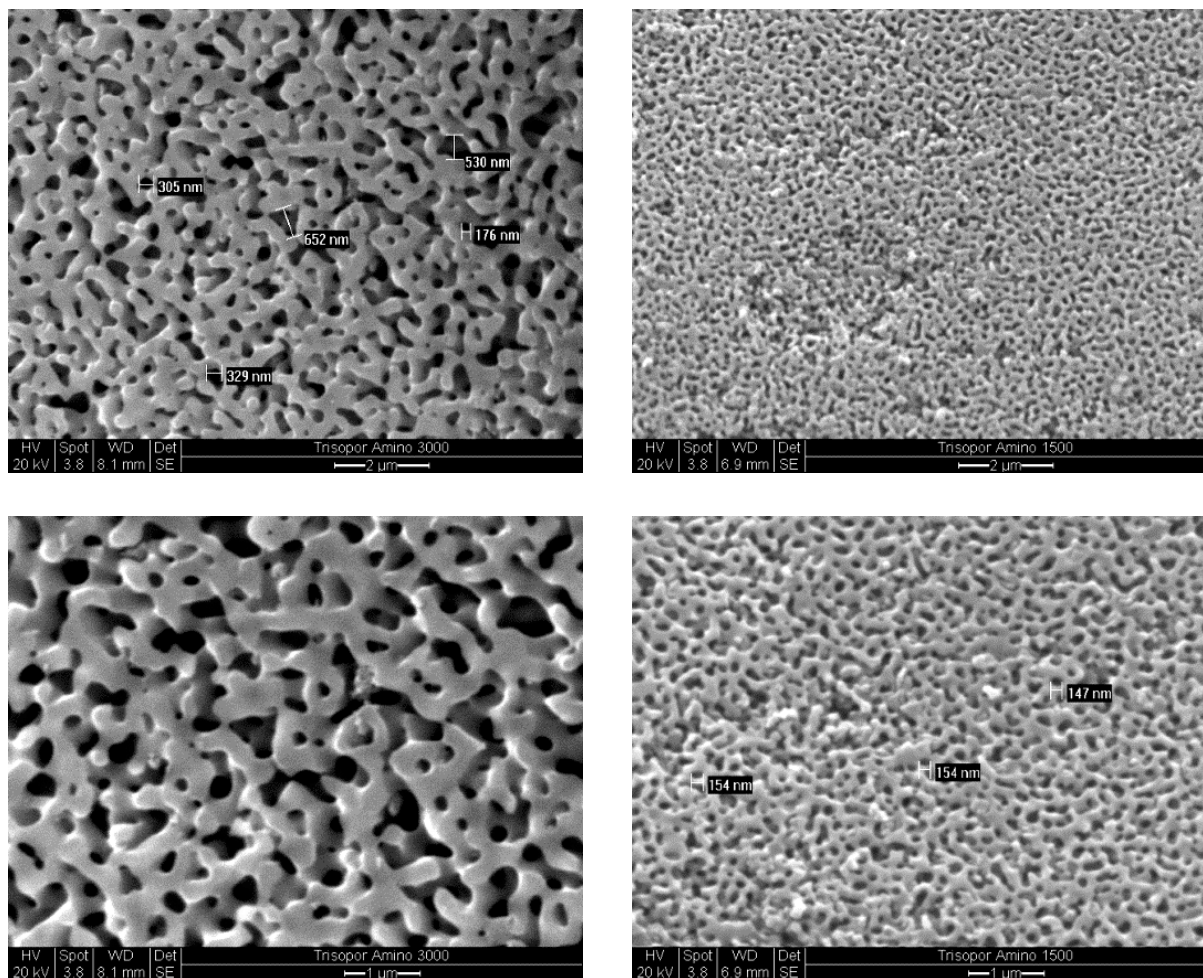


Abbildung 7.7: REM-Aufnahmen von Amino-Trisopor™ 3000 (links) und Amino-Trisopor™ 1500 (rechts.). Der Referenzbalken für die oberen Bilder beträgt 2  $\mu\text{m}$ , für die unteren 1  $\mu\text{m}$ .

Die untersuchten porösen Gläser haben beide eine gleichmäßige Porenstruktur mit recht enger Porengrößenverteilung und ohne besondere Vorzugsrichtung der Poren. Der Porendurchmesser von Amino-Trisopor™ 3000 wurden exemplarisch mit 176, 305, 329, 530 und 629 nm, die von Amino-

Trisopor™ 1500 mit 147 und zweimal mit 154 nm vermessen. Bei der REM-Aufnahme in Abbildung 7.8 erkennt man, dass einige Poren von Trisopor™ 1500 geschlossen sind (Referenzbalken 1  $\mu\text{m}$ ).

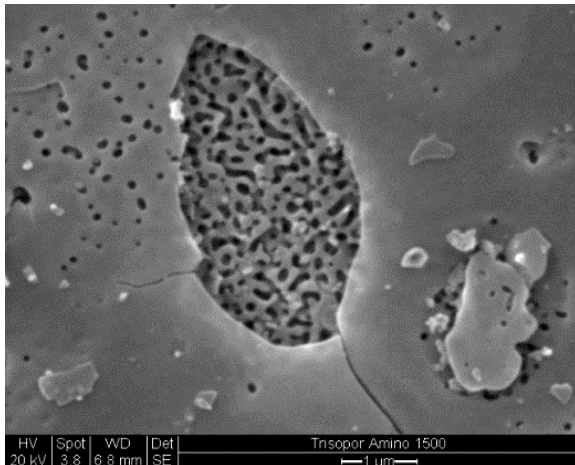


Abbildung 7.8: REM-Aufnahme mit teilweise verschlossenen Poren von Amino-Trisopor™ 1500, Referenzbalken 1  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die vom Hersteller angegebenen Porendurchmesser von 300 und 150 nm. Eine genauere Vermessung der Porengröße und -oberfläche ist mit den Verfahren der Gasadsorption (Stickstoffadsorption) und der Quecksilberporosimetrie möglich.

### 7.5.2 Gasadsorption

Das Material Trisopor™ 1500 ergab bei der Stickstoffadsorptionsmessung (Kap. 3.2.1) ein Porenvolumen von  $51,11 \text{ mm}^3/\text{g}$  und eine BET-Oberfläche von  $20,5 \text{ m}^2/\text{g}$ . Der ermittelte Wert des Porendurchmessers lag zwischen 113,9 und 177,0 nm (Abb. 7.9). Für Trisopor™ 3000 wurde ein Porenvolumen von  $31,85 \text{ mm}^3/\text{g}$  gemessen. Daraus resultierte eine BET-Oberfläche von  $5,98 \text{ m}^2/\text{g}$  und ein Porendurchmesser zwischen 115 und 163 nm (Abb. 7.10).

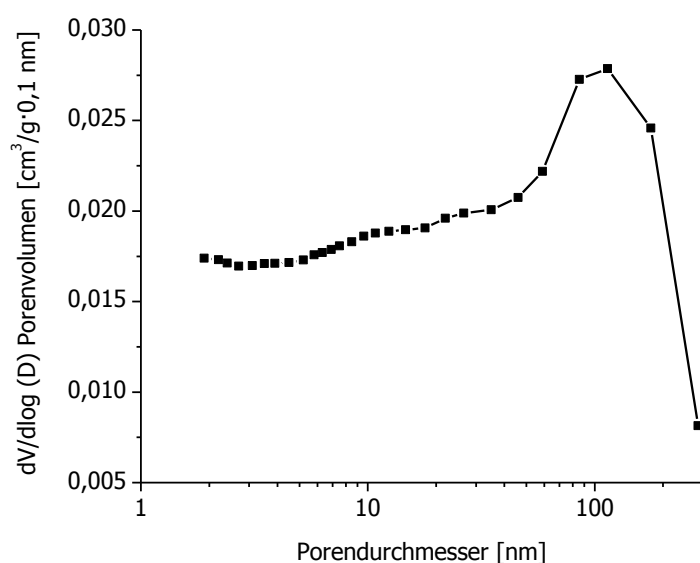


Abbildung 7.9: Porengrößenbestimmung von Amino-Trisopor™ 1500 mittels Stickstoffadsorption (3h bei  $110^\circ\text{C}$  im Vakuum), Auftragung Porendurchmesser gegen Desorption  $dV/d\log(D)$ .

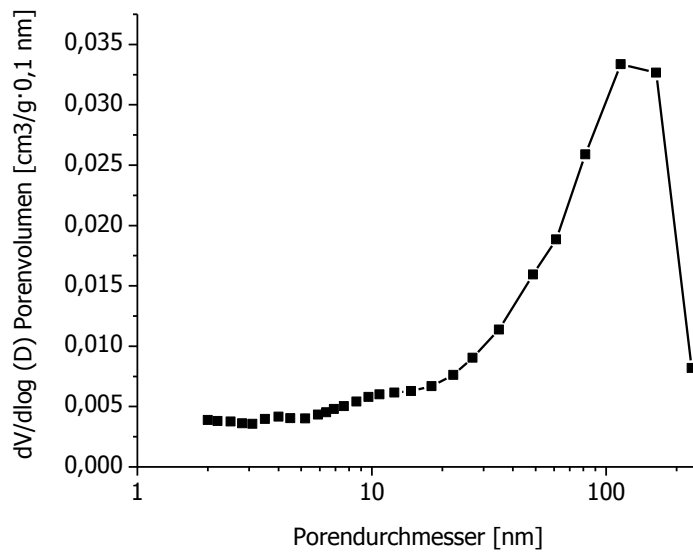


Abbildung 7.10: Porengrößenbestimmung von Amino-Trisopor™ 3000 mittels Stickstoffadsorption (3h bei 110°C im Vakuum), Auftragung Porendurchmesse gegen Desorption  $dV/d\log(D)$ .

Beim Vergleich der mit Hilfe der Gasadsorption gemessenen Porenwerte fällt eine deutliche Diskrepanz zu den Herstellerangaben auf. Die Adsorptionsmethode wird in der Regel für kleine Poren verwendet. Je nach Literatur liegt die obere Detektionsgrenze zwischen 50 und 300 nm. Die Abweichungen könnten somit aufgrund des höheren Fehlers im Grenzbereich der Methode zu erklären sein. Als Alternativmethode wurde deshalb nachfolgend die Bestimmung der Porenwerte mittels Quecksilberporosimetrie angewendet (Kap. 3.2.2).

### 7.5.3 Quecksilber-Intrusionsporosimetrie

Da die Proben der porösen Gläser aus sehr feinen Partikeln bestehen, können während des Füllens des Porengefäßes mit Quecksilber kleine Hohlräume entstehen (Zwischenkornvolumen), die nicht vollständig mit Hg umhüllt werden. Um diesem Effekt auszublenzen, werden die Messungen erst ab 0,3 mPa ausgewertet. Zur Bestimmung der Porengröße werden die Werte logarithmisch aufgetragen.

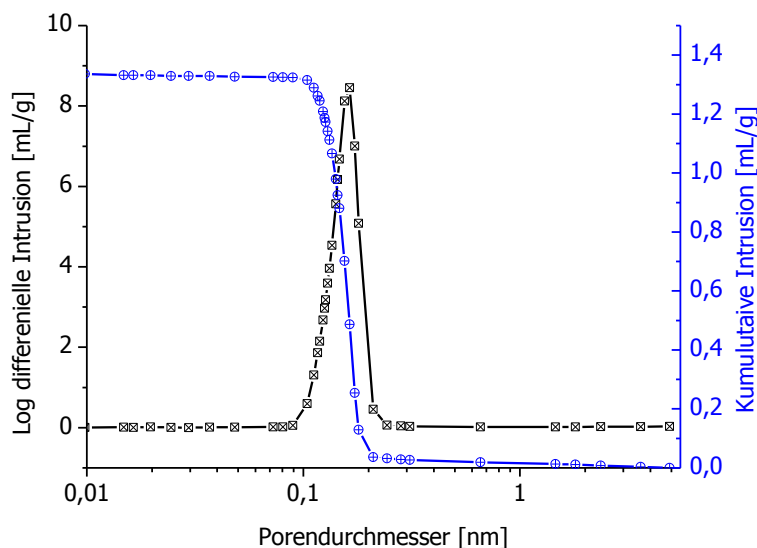


Abbildung 7.11: Porenbestimmung mittels Hg-Porosimetrie von Amino-Trisopor™ 1500.

Bei der Vermessung von Amino-Trisopor™ 1500 war 163 nm der häufigste Porendurchmesser (Abb. 7.11) und das Porenvolumen betrug 1337,4 mm<sup>3</sup>/g, die Porenoberfläche 37,53 m<sup>2</sup>/g (Kap. 3.3.2). Das Material hat eine Bulkichte von 0,532 g/mL, sodass sich nach der Formel

$$\text{Porosität} = \frac{\text{Bulkichte} \cdot \text{Porenvolumen}}{10}$$

eine Porosität von 71% ergibt. Alle Werte bestätigen die Angaben des Herstellers.

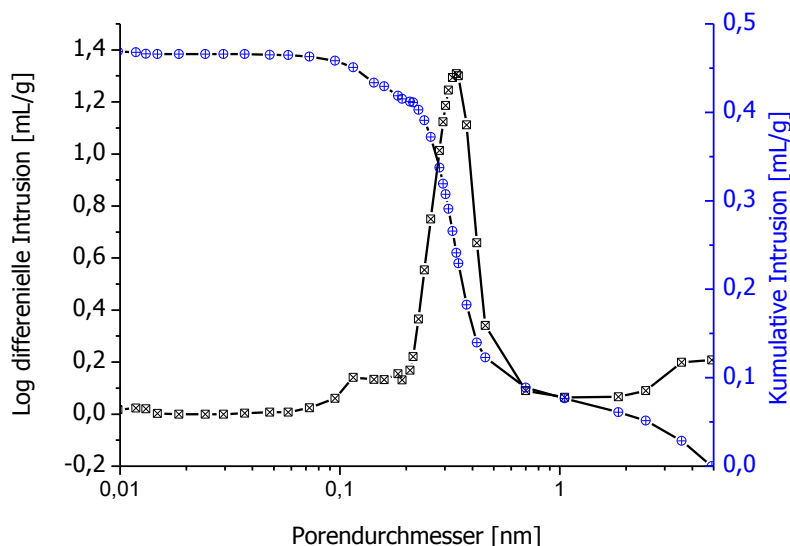


Abbildung 7.12: Porenbestimmung mittels Hg-Porosimetrie von Amino-Trisopor™ 3000.

338 nm wurden für den Porendurchmesser von Amino-Trisopor™ 3000 ermittelt (Abb. 7.12), was mit den Herstellerangaben übereinstimmt. Das Porenvolumen betrug 473,6 mm<sup>3</sup>/g, was lediglich 53% des angegebenen Wertes entspricht. Die totale Porenfläche wurde mit 9,08 m<sup>2</sup>/g bestimmt (71% der Herstellerangaben). Mit einer Bulkichte von 0,491 g/mL, berechnet sich daraus eine Porosität von 23%. Eine zweite Messung bestätigte die gemessenen Werte (Porendurchmesser 322 nm, Porenwandvolumen 484,2 mm<sup>3</sup>/g), sodass davon auszugehen ist, dass die Volumenangabe des Herstellers vom Trisopor™ 3000-Materials nicht korrekt angegeben wurde. Auch die Angabe zur Oberfläche wurde zu groß ausgewiesen. In Tabelle 7.6 werden die gemessenen Daten der Amino-Trisopor™-Materialien den Herstellerdaten zusammenfassend gegenübergestellt.

Tabelle 7.6: Herstellerangaben und gemessene Daten von Amino-Trisopor™ 1500 und 3000.

Größe	Quelle	Amino-Trisopor™ 1500	Amino-Trisopor™ 3000
Partikelgröße [µm]	Bereich	50-100	20-50
Durchschnittliche	Herstellerangaben	152,1	321,82
Porengröße [nm]	Gasadsorption	177,0 - 113,9	115-163
	Hg-Porosimetrie	163	338
	2. Messung		322
Porenvolumen [mm <sup>3</sup> /g]	Herstellerangaben	1379,63	891,4
	Gasadsorption	51,11	31,85
	Hg-Porosimetrie	1337,4	473,6
	2. Messung		484,2
Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Herstellerangaben	40,63	12,79
	Gasadsorption BET	20,51	5,98
	Hg-Porosimetrie	37,53	9,08
	2. Messung		7,43

Die Ergebnisse legen nahe, dass das Amino-Trisopor™ 1500 für die Affinitätsanwendung geeigneter ist, da sowohl die Partikelgröße einheitlicher als auch die Oberfläche größer ist. Jedoch muss experimentell geklärt werden, ob die Immobilisierung bei Verwendung der 150 nm-Poren nicht diffusionskontrolliert und somit kinetisch gehemmt ist, um sicher zu stellen, dass eine gute Immobilisierungsdichte erzielt werden kann. Auch soll die TNT-Affinitätssäule letztendlich eine schnelle Kinetik aufweisen.

## 7.6 Immobilisierungsmethoden für Amino-Trisopor™

### 7.6.1 Immobilisierungsmethoden für Amino-aktivierte Trägermaterialien

Zur Immobilisierung von Proteinen an Aminogruppen hat sich die Glutaraldehyd-Methode etabliert (Kap. 2.2.2). Die funktionellen Gruppen, die Aminogruppen, werden im ersten Schritt zu Aldehydgruppen gewandelt. Daraus resultiert eine zusätzliche Spacerverlängerung. Die anschließende Proteinbindung erfolgt über eine Schiff'sche Base durch Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das Protein durch den Einsatz des Reduktionsmittels partiell reduziert werden kann.

Als Alternative wird eine NHS-Aktivierung über einen Bis-NHS-Ester getestet (Abb. 7.13).

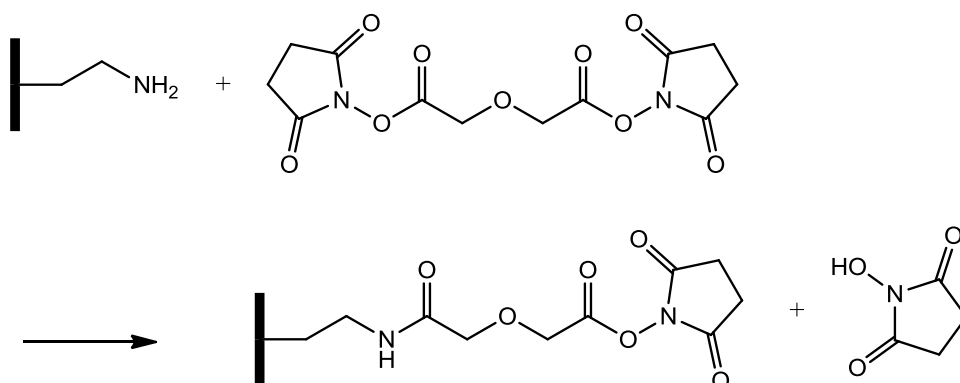


Abbildung 7.13: Reaktionsschema der Aktivierung eines Amino-Trägermaterials mit einem Bis-NHS-Ester.

Die Immobilisierung des Proteins erfolgt nach der bewährten NHS-Kopplung (Abb. 7.14).

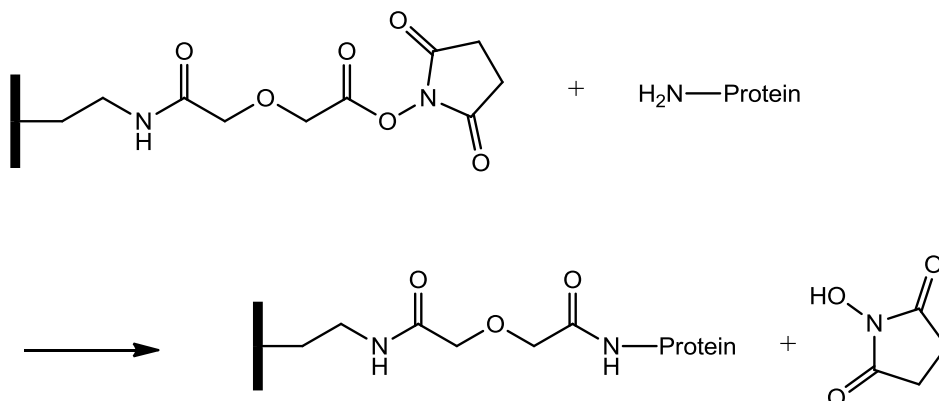


Abbildung 7.14: Proteinkopplung an dem NHS-aktivierten Trägermaterial.

### 7.6.2 Auswertung der Immobilisierung via Bis-NHS-Ester-Methode

Um die aus der Aktivierung resultierende Menge an NHS-Gruppen zu bestimmen, wurde das hergestellte NHS-Trägermaterial hydrolysiert und das freigewordene Hydroxysuccinimid anschließend spektroskopisch bei 261 nm quantitativ bestimmt (Abb. 7.15).

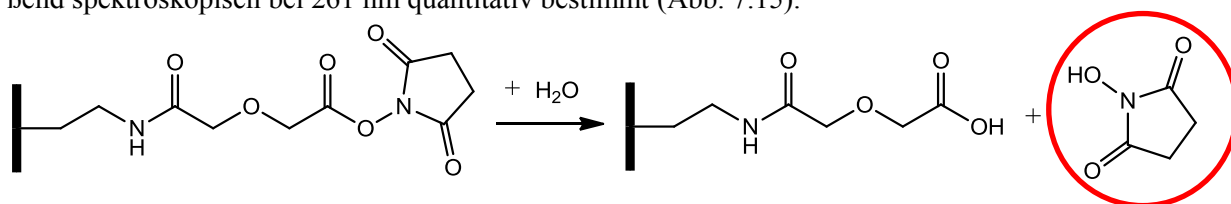


Abbildung 7.15: Hydrolyse des NHS-aktivierten Trägermaterials.

Nach Aktivierung des Amino-Trisopor™-Materials unter Verwendung eines Bis-NHS-Esters (gelöst in wasserfreiem Dioxan) wurde der überschüssige Bis-NHS-Ester beim ersten Versuch durch Waschen mit Dioxan und ACN entfernt. Beim zweiten Versuch wurde das Lösungsmittel nach dem Waschen mit Lösungsmittel anschließend noch mit 0,1 M und 0,01 M PBS, pH 6 gewaschen (Dauer ca. 10 min), wie es bei einer späteren Immobilisierung mit Proteinen notwendig wäre, um einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen. Nach der milden Hydrolyse des aktivierten NHS-Materials mit PBS, wurden die Überstände im UV vermessen [252]. Zuvor wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 7.16).

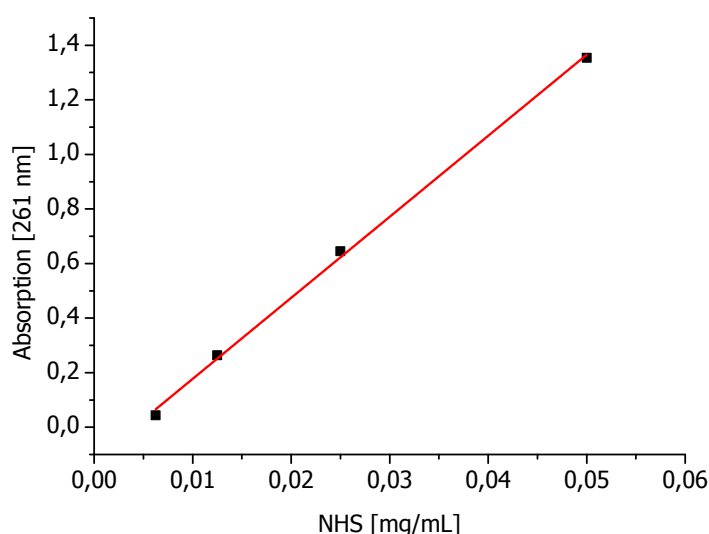


Abbildung 7.16: Kalibriergerade von N-Hydroxysuccinimid:  $y = -0,120 + 29,703 \cdot x$ ,  $R = 0,9994$ .

Die Aktivierung mit der Bis-NHS-Ester-Methode mit anschließendem Waschvorgang mit reinen Lösungsmitteln führt zu einer NHS-Gruppen-Belegung von ca. 15,3  $\mu\text{mol}$  pro g Trisopor™ 1500 und 6,4  $\mu\text{mol}$  pro g Trisopor™ 3000 (Tab. 7.7).

Tabelle 7.7: Hydrolysiertes NHS-aktiviertes Trisopor™, gewaschen mit LM (Dioxan und ACN).

Amino-Trisopor™	Trisopor™ nach Hydrolyse [mg]	Extinktion (Verdünnung)	Volumen des Überstands [ $\mu\text{L}$ ]	NHS-Gruppen pro g Trisopor™ [ $\mu\text{mol}$ ]
1500	18,9	0,367 (1:10)	200	15,08
1500	20,2	0,418 (1:10)	200	15,56
3000	19,7	0,311 (1:5)	200	6,40

Dies entspricht 6,3-6,7% der anfänglich vorhandenen Aminogruppen. Trisopor™ 1500 hat eine Schüttdichte von  $0,29 \text{ g/cm}^3$ , sodass das NHS-aktivierte Trisopor™ 1500 eine Ligandendichte von  $4,4 \text{ } \mu\text{mol pro mL}$  Trägermaterial hat. Die Ligandendichte von kommerziell erhältlichen NHS-aktivierten Trägermaterial, wie z. B. von NHS-aktivierter Sepharose™ 4 Fast Flow beträgt  $16\text{-}23 \text{ } \mu\text{mol pro mL}$  Matrix und ist somit deutlich höher (4-5-fach).

Wenn vor der Hydrolyse ein zusätzlicher Waschschriff mit PBS vorgeschaltet wurde (Tab. 7.8), welche für eine Immobilisierung von nativen Proteinen unerlässlich ist, führte die frühzeitig einsetzende Hydrolyse zu einer Reduzierung der NHS-Gruppen um ca. 30%. Dann stehen lediglich Belegungen von  $4,9 \text{ } \mu\text{mol pro g}$  Trisopor™ 1500 bzw.  $2,0 \text{ } \mu\text{mol pro g}$  Trisopor™ 3000 für die anschließende Kopplung zur Verfügung.

*Tabelle 7.8: Hydrolysiertes NHS-aktivierte Trisopor™, gewaschen mit PBS-Puffer, pH 6.*

Amino-Trisopor™	Trisopor™ nach Hydrolyse [mg]	Extinktion (Verdünnung)	Volumen des Überstands [ $\mu\text{L}$ ]	NHS-Gruppen pro Trisopor™ [ $\mu\text{mol/g}$ ]
1500	18,6	0,93 (1:2,5)	120	4,95
1500	19,5	0,418 (1:5)	120	4,84
3000	10,6	0,529 (unverdünnt)	110	1,97

### 7.6.3 Abschätzung der benötigten Ligandendichte für eine IgG-Monolayer

Um die benötigte Ligandendichte für eine spätere Immobilisierung von IgG an den porösen Gläsern abzuschätzen, wurde der Flächenbedarf einer IgG-Monolayerschicht berechnet. Daraus kann die minimale Anzahl der benötigten aktivierten Gruppen am Trägermaterial ermittelt werden.

Mit den typischen Dimensionen von IgG:  $15,5 \text{ nm} \times 8,5 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$  [253, 254] kann die Oberflächenbelegung der porösen Gläser mit Antikörpern abgeschätzt werden. Um die Anzahl an IgGs, die in einer Monolayerschicht an der Oberfläche angelagert werden können zu berechnen, wird angenommen, dass sich die Moleküle flach auf der Oberfläche des Trägermaterials positionieren (größte Wechselwirkung). Der Flächenbedarf lässt sich folglich grob mit  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  abschätzen.

$$15,5 \text{ nm} \cdot 8,5 \text{ nm} = 1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$$

Somit ergibt sich eine maximale IgG-Belegung bei Amino-Trisopor™ 1500 von ca.  $512 \text{ nmol}$  bzw. von  $73,7 \text{ mg}$  IgG pro g Trägermaterial (Tab. 7.9).

$$\frac{\text{Oberfläche des Trägermaterials}}{\text{Flächenbedarf IgG} \cdot N_A} = (\text{IgG} - \text{Belegung})_{\text{max}}$$

*Tabelle 7.9: Theoretisch berechnete maximale IgG-Belegung (Monolayer) der porösen Gläser unter der Annahme, dass ein IgG-Molekül einen Platzbedarf von  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  benötigt.*

Material	Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	max. IgG-Belegung [ $\text{nmol/g}$ ]	max. IgG-Belegung [ $\text{mg/g}$ ]
Amino-Trisopor™ 1500	40,63	512	73,7
Amino-Trisopor™ 3000	12,79	161	23,2

Unter dieser Packungsannahme, könnten bei Amino-Trisopor™ 1500 ( $243,56 \text{ } \mu\text{mol/g}$ ) nur 2,1‰ der Aminogruppen Antikörper binden, bei NHS-aktivierten Trisopor™ 1500, gewaschen mit Lösungs-

mitteln (Ligandendichte 15,3  $\mu\text{mol/g}$ ) 3,35% der NHS-Gruppen und bei NHS-aktivierten, mit PBS gewaschenen Trisopor™ 1500 (Ligandendichte 4,9  $\mu\text{mol/g}$ ), 10,4% der NHS-Gruppen. Diese Werte sind zusammen mit den entsprechenden Werten bei Verwendung von Trisopor™ 3000 in der Tabelle 7.10 zusammengestellt.

*Tabelle 7.10: Ligandendichte der porösen Gläser sowie der prozentuale Anteil, der zur Kopplung verwendet werden müsste, um einen IgG-Monolayer zu erhalten, unter der Annahme, dass ein IgG-Molekül einen Platzbedarf von  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  benötigt.*

Material	Ligandendichte [ $\mu\text{mol/g}$ ]	Anteil [%] um IgG-Monolayer zu erhalten
Amino-Trisopor™ 1500	243,56	0,21
NHS-Trisopor™ 1500, mit LM	15,3	3,35
NHS-Trisopor™ 1500, nur PBS	4,9	10,4
Amino-Trisopor™ 3000	95,26	0,17
NHS-Trisopor™ 3000, mit LM	6,41	3,98
NHS-Trisopor™ 3000, nur PBS	1,97	12,2

Die alternative Aktivierung mittels Bis-NHS-Ester ist somit eine gute Methode ohne störende Nebenreaktionen, um ein sauberes Ausgangsmaterial zur Affinitätskopplung zu erhalten. Die durch die Aktivierung erzeugten NHS-Gruppen stehen für eine IgG-Monolayerschicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Während des Waschprozesses mit PBS beginnt die Hydrolyse der NHS-Gruppen, sodass dieser Schritt zügig durchgeführt werden sollte. Das Material Trisopor™ 3000 hat, wie erwartet, eine geringere NHS-Belegung als das entsprechende kleinporigere poröse Glas Trisopor™ 1500. Somit ist Amino-Trisopor™ 1500 als Trägermaterial für die Herstellung einer HPLC-fähigen TNT-Affinitätssäule besser geeignet, zumal durch die einheitlichere Partikelgröße eine bessere Druckstabilität der Säule gewährleistet wird. Auch die von Renkin geforderte Porengröße für ein geeignetes Affinitätsmaterial (mindestens fünfmal größer als der Ligand, Kap. 2.2.1) wird von Trisopor™ 1500 erfüllt (Porendurchmesser ca. 150 nm, größte Ausdehnung eines Antikörpers ca. 15,5 nm) [144].



## 8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen bzw. von gebundenen Proteinmengen

Zunächst wurde der am häufigsten verwendete Proteintest, der BCA-Assay, verwendet und dessen zeitabhängige Farbentwicklung untersucht. Bei der Proteinbestimmung zur Berechnung der Immobilisierungsdichte eines Affinitätsmaterials war die Wechselwirkung mit dem Trägermaterial bei diesem Test so groß, dass nur vergleichende Aussagen und keine Quantifizierungen erfolgen konnten. Daher wurden zwei alternative Proteinbestimmungsmethoden entwickelt. Die Dabsylmethode nutzt ein orangefarbenes Dabsyl-Protein-Konjugat, um die Immobilisierungsdichten bei Verwendung von unterschiedlichen Trägermaterialien oder Immobilisierungsmethoden anhand der Farbintensität zu bestimmen. Die Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA) ermöglicht eine Quantifizierung nach kompletter Hydrolyse des Affinitätsmaterials.

### 8.1 BCA-Test

#### 8.1.1 Zeitabhängigkeit des BCA-Tests

Der BCA-Test ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Konzentration wird spektroskopisch bei 562 nm bestimmt. *Pomory* [195] prüfte die Farbentwicklung des *Lowry*-Test bis zu einer Zeit von 2 h und stellte dabei fest, dass diese nach der üblichen im Protokoll vorgegeben Zeit (30 min) noch lange nicht beendet war.

Im nachfolgenden Experiment sollte sowohl die Linearität des BCA-Assays als auch die Zeitabhängigkeit der Farbentwicklung des Tests in dem Zeitintervall von 11 bis 375 min untersucht werden. Die Messungen wurden gemäß des Protokolls des Kits für die Bestimmung im Mikrotiterformat mit 10  $\mu\text{L}$  Probe und 200  $\mu\text{L}$  BCA-Reagenz durchgeführt [241].

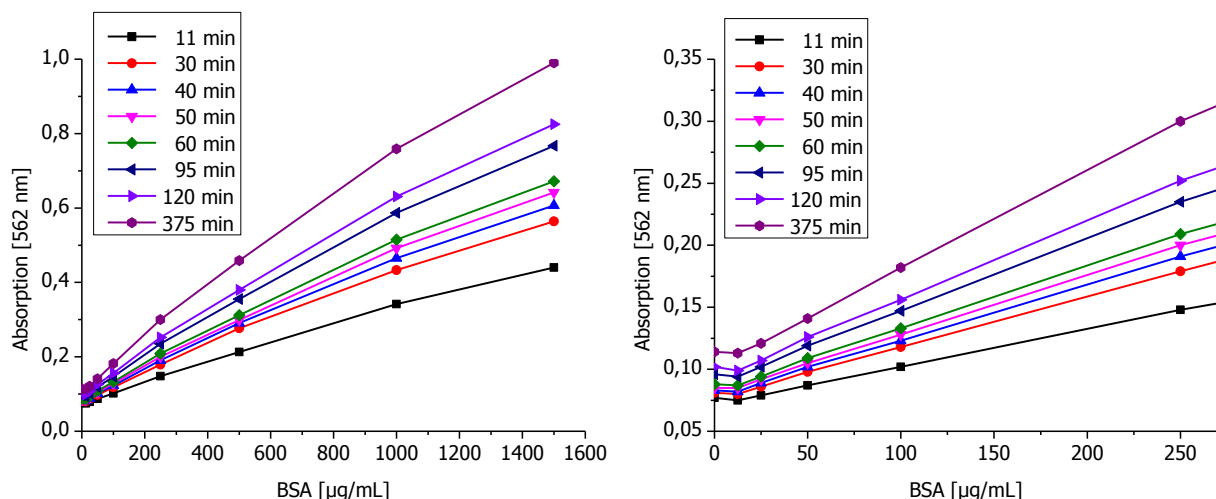


Abbildung 8.1: BCA-Test: Extinktionen nach unterschiedlich langen Entwicklungszeiten von BSA-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen (links), Ausschnittsvergrößerung (rechts).

Die geringste Proteinkonzentration war entsprechend der im Testprotokoll angegebenen Nachweisgrenze 20 mg/L, die höchste 1,5 g/L. Ab einer Konzentration von 500 g/L BSA ist der Kurvenverlauf nicht mehr linear (Abb. 8.1).

Außerdem wird anhand dieses Experiments deutlich, dass die Farbreaktion, die dem BCA-Test zugrunde liegt, nach 2 h ebenfalls noch nicht abgeschlossen ist. Der zeitliche Verlauf der Absorption kann mittels der in Origin® implementierten Formel "Exponential associate" (ExpAssoc) angenähert werden.

$$y = y_0 + A_1 \cdot (1 - e^{-\frac{x}{t_1}}) + A_2 \cdot (1 - e^{-\frac{x}{t_2}})$$

Für die zeitliche Entwicklung des Reaktionsprodukts bei den BSA-Konzentrationen 250 µg/mL und 1000 µg/mL werden die Näherungen in Abbildung 8.2 veranschaulicht. Die Fitparameter betragen  $y_0 = -2,179$ ;  $A_1 = 0,167$ ;  $t_1 = 108,50$ ;  $A_2 = 2,317$ ;  $t_2 = 1,881$  bzw.  $y_0 = 0,326$ ;  $A_1 = 0,224$ ;  $t_1 = 108,19$ ;  $A_2 = 2,224$ ;  $t_2 = 108,19$ .

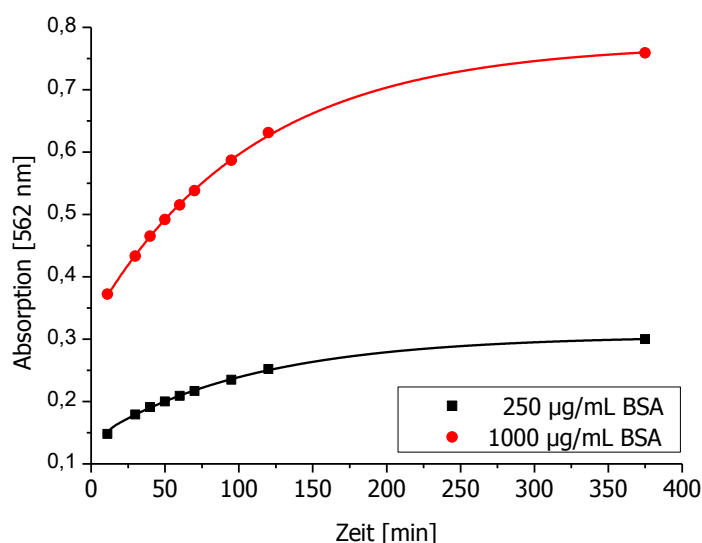


Abbildung 8.2: Zeitliche Entwicklung des BCA-Tests der BSA-Proben mit den Konzentrationen 0,250 g/L und 0,5 g/L, angenähert mit der Funktion "Exponential associate".

Aufgrund der starken Zeitabhängigkeit der Absorption ist bei Messungen mehrerer Proben somit stets eine parallele Mikrotiterplattenmessung der sequenziellen Küvettenmessung vorzuziehen.

### 8.1.2 pH-Optimierung für die Proteinimmobilisierung via Bis-NHS-Ester-Methode

Um die Ausbeute der Immobilisierung bei der Verwendung der Bis-NHS-Ester-Methode zu optimieren, wurde der optimale pH-Wert zur Kopplung ermittelt. Dazu wurden BSA-Lösungen gleicher Konzentration mit unterschiedlichen pH-Werten an Amino-Trisopor™ gekoppelt und die Immobilisierungsdichten bestimmt.

Im ersten Schritt werden die funktionellen Gruppen des Amino-Trisopors™ mittels Bis-NHS-Methode zu NHS-Gruppen gewandelt. Als Lösungsmittel wird wasserfreies Dioxan mit dem Additiv Triethylamin als Base verwendet. Anschließend wird die Kopplung zwischen dem Trägermaterial und dem Protein bei unterschiedlichen pH-Werten (zwischen pH 4,0 und 8,3) durchgeführt.

Bei der ersten Versuchsreihe wurden pH-Werte zwischen 6,13 und 8,32 verwendet, bei der zweiten wurden pH-Werte zwischen 4,01 und 6,13 gewählt. Der Kopplungserfolg wurde mittels BCA-Test untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 8.3 wiedergegeben.

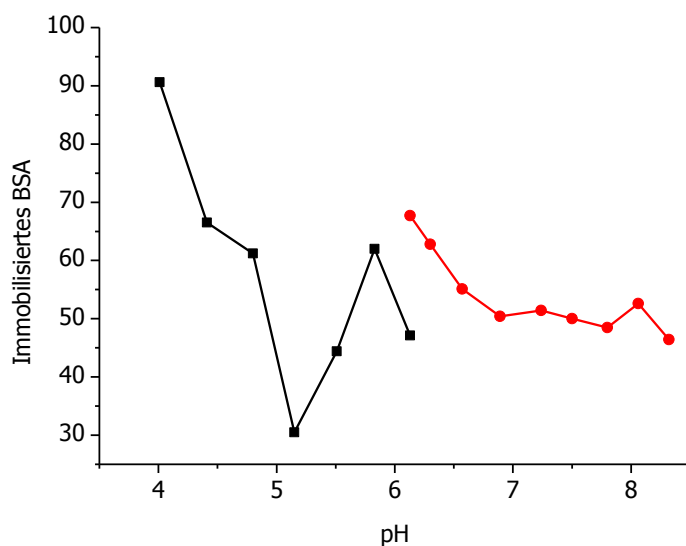


Abbildung 8.3: pH-Abhängigkeit der Kopplung mit Bis-NHS-Ester, Bestimmung mittels BCA-Test.

Auffallend ist die deutlich größere Immobilisierungsdichte bei pH 4 gegenüber den Dichten bei höheren pH-Werten. Nach der Theorie sollte die Kinetik der Reaktion unterhalb pH 5 sehr langsam verlaufen, sodass ein kleinerer Wert erwartet wurde [255]. Ursache der scheinbar hohen Immobilisierungsdichte könnte eine adsorptive Anlagerung statt der gewünschten kovalenten Bindung sein, da der isoelektrische Punkt von Albumin bei 4,6 liegt.

Die Immobilisierungsdichten wurden aus den Differenzen der BSA-Konzentrationen der Proben vor und nach der Kopplung berechnet. Jedoch ist die Verwendung des BCA-Tests für absolute Proteinbestimmungen von an Trisopor™ immobilisierten BSA nicht geeignet, da Trisopor™ auch ohne Proteinimmobilisierung bereits einen hohen Absorptionswert hervorruft. NHS-aktiviertes, gewaschenes Trisopor™ führte z. B. zu einer Extinktion von 0,510. Daher ist eine Verwendung des BCA-Tests bei Proteinbestimmungen an Trägermaterialien lediglich für direkte Vergleichsmessungen möglich.

## 8.2 Die Dabsylmethode zur Bestimmung der Immobilisierungsdichte

Um den Erfolg der Immobilisierungsmethoden, d. h. die Kopplungsdichte an Affinitätssäulen, leicht zu bestimmen, wurde ein gefärbtes Protein synthetisiert. Nach Immobilisierung des gefärbten Proteins konnte der Immobilisierungserfolg direkt an der Farbintensität des Trägermaterials erkannt werden. Um die Immobilisierungsdichte zu quantifizieren, wurde eine partielle Hydrolyse durchgeführt. Dadurch wurden die Peptidbindungen gespalten, das Farbstoffmolekül wurde vom Trägermaterial getrennt und ging in die flüssige Phase über. Die Lösung wurde anschließend spektroskopisch analysiert.

### 8.2.1 Charakterisierung der Dabsyl-BSA-Lösung

Als gefärbtes Protein wurde Dabsyl-BSA zunächst unter denaturierenden, später unter weitgehend nativen Bedingungen, synthetisiert (Abb. 8.4). Damit Dabsyl-BSA weiterhin an die Matrix binden kann, wurden nur wenige der 35 Aminogruppen des BSA mit Dabsyl gekoppelt. Es wurde ein Verhältnis von Dabsyl-BSA:BSA = 10:1 für die Synthese gewählt.

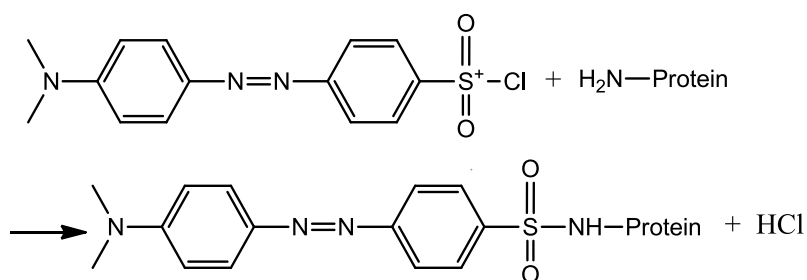


Abbildung 8.4: Reaktionsschema zur Dabsyl-Kopplung an Proteine.

Das synthetisierte Dabsyl-BSA wurde mit MALDI-TOF/MS analysiert (Abb. 8.5), um die Kopplungsdichte nach der folgenden Formel zu bestimmen:

$$\text{mittlere Kopplungsdichte}_{\text{Dabsyl-BSA}} = \frac{\text{Peakmax}_{\text{Dabsyl-BSA}} - \text{Peakmax}_{\text{BSA}}}{M_{\text{Dabsylrest}}}$$

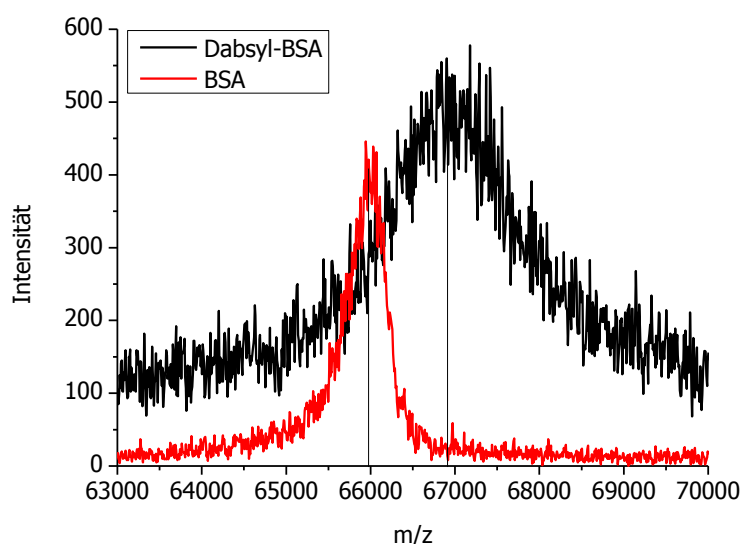


Abbildung 8.5: MALDI-TOF/MS-Spektren von Dabsyl-BSA und BSA, Peakmaxima  $m/z = 65977$  (BSA) und  $66911$  (Dabsyl-BSA), Kopplungsdichte 3,24.

Mit den Peakmaxima bei  $m/z$  von 66911 und 65977 und  $M_{\text{Dabsylrest}} = 288,08$  g/mol ergibt sich eine mittlere Kopplungsdichte von 3,24. An dem gegenüber BSA deutlich breiteren Peak des Dabsyl-BSA-Konjugats (Abb. 8.5) wird klar, dass bei der Synthese erwartungsgemäß kein einheitliches Produkt entstand, sondern ein Produktgemisch mit einer breiten Varianz an Kopplungsdichten zwischen 0 und 10 Dabsylgruppen pro BSA. Diese Verbindungen sind statistisch gemischt, sodass das Produkt mit der Gesamtzahl der Verbindungen mit einer durchschnittlichen Kopplungsdichte sinnvoll charakterisiert werden kann.

Um die Konzentration der Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion (E) der Lösung (1:50 verdünnt) bei 473 nm im Spektrometer mit 0,371 verwendet.

$$E = \varepsilon \cdot c(\text{Glycin}) \cdot d$$

$$\Rightarrow c_{\text{Dabsyl-BSA}} = \frac{E \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\varepsilon \cdot d \cdot \text{Kopplungsdichte}}$$

Die Abschätzung der Konzentration mit dem Extinktionskoeffizienten von Dabsyl-Glycin bei 473 nm  $\epsilon = 1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [256], und der Molmasse von Dabsyl-BSA = 66911 g/mol, ergibt eine Konzentration der Dabsyl-BSA-Lösung von 0,30 mM bzw. 20,2 g/L ( $d = 1 \text{ cm}$ , Kopplungsdichte 3,24, Verdünnungsfaktor 50, Extinktion 0,371) (Tab. 8.1).

### 8.2.2 Charakterisierung der weitgehend nativen Dabsyl-markierten BSA-Lösung

Um ein weitgehend natives Dabsyl-BSA zu erhalten, wurden die Synthesebedingungen geändert, indem der Lösungsmittelanteil verringert, dafür jedoch die Reaktionszeit verlängert wurde (Kap. 5.5.2). Mit Hilfe des MALDI-TOF/MS-Spektrums kann der Erfolg der Synthese bestätigt und die Kopplungsdichte bestimmt werden (Abb. 8.6).

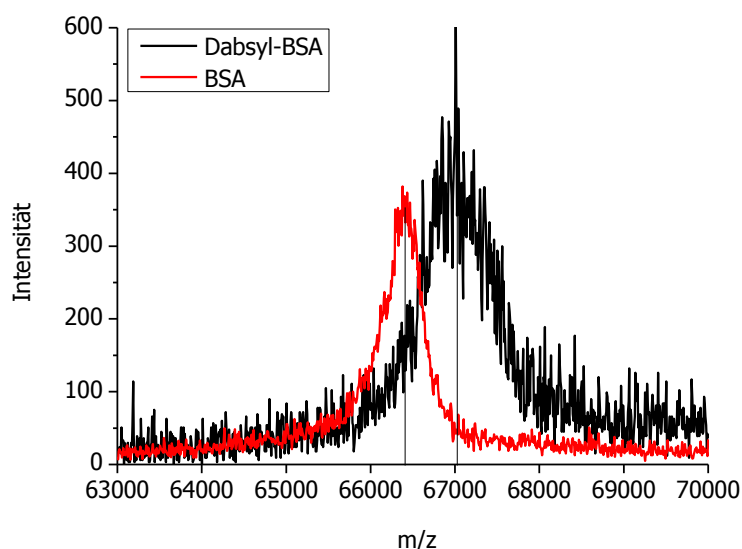


Abbildung 8.6: MALDI-TOF/MS-Spektren von weitgehend nativem Dabsyl-BSA und von BSA, Peakmaxima bei  $m/z = 66410$  (BSA) und  $67026$  (Dabsyl-BSA), mittlere Kopplungsdichte 2,14.

Die Kopplungsdichte des Dabsyl-BSA-Konjugats beträgt 2,14. Die Konzentrationsabschätzung erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion einer 1:10 verdünnten Lösung ( $E_{473 \text{ nm}} = 0,768$ ) und ergab eine Konzentration von 0,189 mM bzw. 12,6 g/L (Tab. 8.1).

Tabelle 8.1: Kopplungsdichten der Dabsyl-BSA-Konjugate sowie die Konzentrationen der Lösungen.

Lösung	Kopplungsdichte	Konzentration [mM]	Konzentration [g/L]
Dabsyl-BSA	3,24	0,301	20,2
Weitgehend natives Dabsyl-BSA	2,14	0,189	12,6

Misst man die Extinktion im sauren Milieu ( $60 \mu\text{L} + 10 \mu\text{L}$  6 M HCl) der 1:20 verdünnten Lösung, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 505 nm und der Extinktionskoeffizient erhöht sich deutlich auf  $3,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 8.2.3 Charakterisierung der Dabsyl-IgG-Lösung

Um dieses Verfahren für die Antikörper-Immobilisierung an Affinitätssäulen besser anzupassen, wurde Dabsyl-IgG hergestellt. Die erste Synthese, in der ein Verhältnis von IgG:Dabsylchlorid von 1:30 gewählt wurde, führte zu einem unlöslichen Dabsyl-IgG. Im zweiten Versuch wurde daher ein

sehr kleines Verhältnis von 1:1,65 gewählt, was zu einer sehr kleinen Kopplungsdichte führte. Eine Bestimmung der Kopplungsdichte mittels MALDI war nicht möglich, da IgG keine guten MALDI-TOF/MS-Spektren liefert. Daher konnte die Kopplungsdichte nur spektroskopisch abgeschätzt werden. Unter der Annahme einer IgG-Konzentration von 10 mg/mL ergab sich eine Kopplungsdichte von 0,37, berechnet mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Dabsyl-Glycin (Extinktion bei 477 nm: 0,481,  $d = 1$  cm,  $M_{\text{Dabsyl-IgG}} = 145066$  g/mol):

$$\text{Kopplungsdichte} = \frac{E \cdot \text{Molmasse}(\text{Dabsyl} - \text{IgG})}{\epsilon \cdot d \cdot c(\text{Dabsyl} - \text{IgG})}$$

#### 8.2.4 Vergleich verschiedener Immobilisierungsmethoden von Dabsyl-BSA an Trisopor™

Mit Hilfe des höher gekoppelten und somit intensiver gefärbten Dabsyl-BSAs wurden die Immobilisierungsausbeute der beiden porösen Gläser Amino-Trisopor™ 1500 und Amino-Trisopor™ 3000 verglichen. Zusätzlich wurden verschiedene Immobilisierungstechniken an den porösen Gläsern geprüft. Als weiteres Trägermaterial wurde aus nativen Trisopor™ ein epoxy-aktiviertes poröses Glas durch Silanisierung hergestellt. Die Silanisierung erfolgte mit unterschiedlicher Vorbehandlung des nativen Materials: Erstens ohne Vorbehandlung, zweitens mit saurer und drittens mit alkalischer Vorbehandlung. Durch die Säure bzw. Base wurde die Oberfläche gereinigt und sollte daher besser für die Funktionalisierung aktiviert sein. Die Silanisierung erfolgte mit dem Reagenz (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (Abb. 8.7).

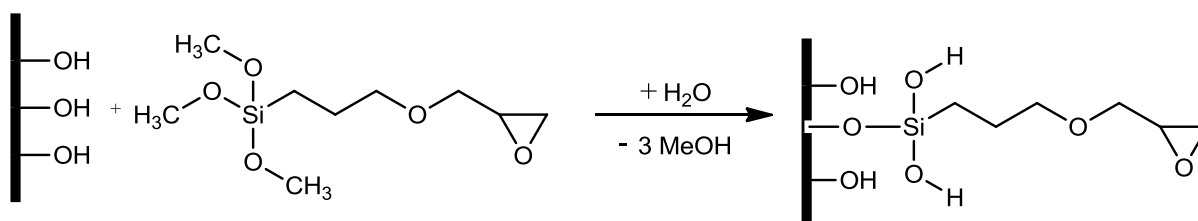


Abbildung 8.7: Reaktionschema zur Silanisierung.

Als Alternative zur Glutaraldehyd-Methode und zur Bis-NHS-Methode wurden die funktionellen Gruppen mit Glutarsäureranhydrid (gelöst in wasserfreiem Dioxan) in Carboxylgruppen umgewandelt und anschließend mit NHS aktiviert (Abb. 8.8).

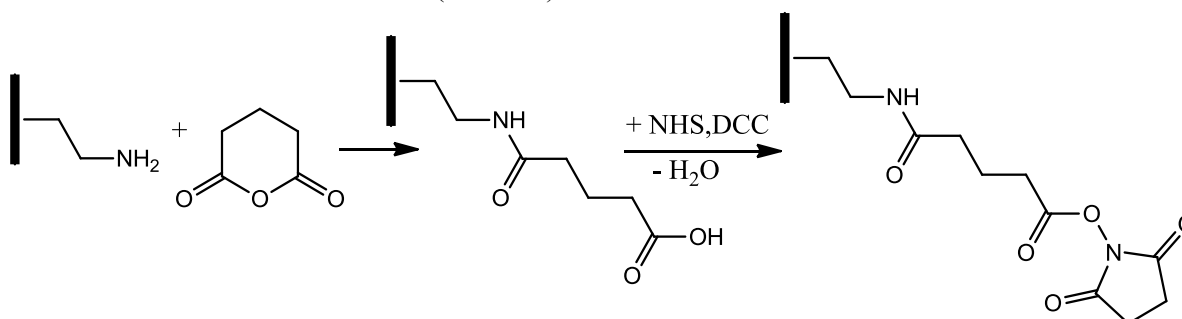


Abbildung 8.8: Reaktionsschema zur Umwandlung der Aminogruppen in Carboxylgruppen mit anschließender NHS-Aktivierung und Protein-Kopplung.

Somit wurden folgende Immobilisierungsmethoden durchgeführt: Glutaraldehyd-, Bis-NHS-, Epoxy-Methode und Umwandlung mit Glutarsäureranhydrid mit anschließender NHS-Aktivierung. Für alle Proben wurde jeweils 10 mg Trisopor™ eingewogen und entsprechend der Methode aktiviert. Zur

Kopplung wurde das aktivierte Material gewaschen, mit 20  $\mu$ L Dabsyl-BSA (0,301 mM, Kopplungsdichte 3,2) versetzt und mit 40  $\mu$ L des für die Methode entsprechenden Puffers verdünnt. Bei der NHS-Aktivierung nach der Verwendung von Glutarsäureanhydrid wurden die Beads nach der Aktivierung mehrmals mit Dioxan gewaschen (Variante 1). Bei einer modifizierten Anwendung der Methode wurden die Beads zusätzlich abschließend noch mit Reinstwasser gewaschen, um eine Denaturierung der Proteine beim folgenden Immobilisierungsschritt zu verhindern (Variante 2). An der Färbung kann der Immobilisierungserfolg bereits leicht abgeschätzt werden (Abb. 8.9).

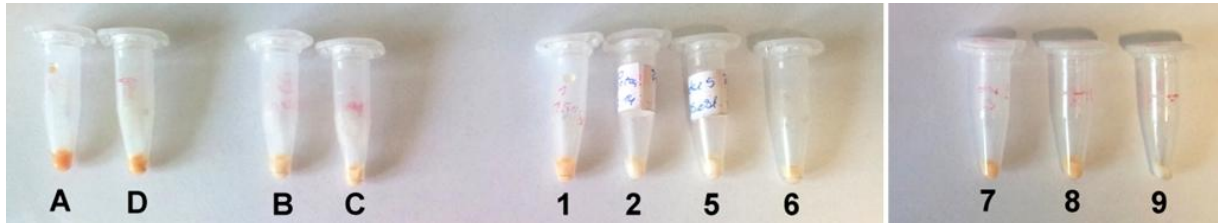


Abbildung 8.9: Verschiedene mit Dabsyl-BSA gekoppelte Trisopor™-Proben:

Probe A: Glutaraldehyd-Methode, Amino-Trisopor™ 1500\*

Probe D: Glutaraldehyd-Methode, Amino-Trisopor™ 3000

Probe B: Bis-NHS-Methode, Amino-Trisopor™ 1500

Probe C: Bis-NHS-Methode, Amino-Trisopor™ 3000

Probe 1: Anhydrid mit NHS-Aktivierung, Amino-Trisopor™ 1500 (Variante 1: Beads in Dioxan)

Probe 2: Anhydrid mit NHS-Aktivierung, Amino-Trisopor™ 1500 (Variante 2: Beads in Reinstwasser)

Probe 5: Anhydrid mit NHS-Aktivierung, Amino-Trisopor™ 3000 (Variante 2: Beads in Reinstwasser)

Probe 6: Anhydrid mit NHS-Aktivierung, Amino-Trisopor™ 3000 (Variante 1: Beads in Dioxan)

Probe 7: natives Trisopor™, silanisiert ohne Vorbehandlung der Oberfläche, Epoxydierung

Probe 8: natives Trisopor™, silanisiert mit saurer Vorbehandlung der Oberfläche, Epoxydierung

Probe 9: natives Trisopor™, silanisiert mit basischer Vorbehandlung der Oberfläche, Epoxydierung.

\*Da sich der Überstand der Probe A nach kurzer Zeit entfärbt hat, wurde nochmal die doppelte Menge Dabsyl-BSA-Puffer-Lösung zugegeben.

Die Immobilisierungsdichte von Amino-Trisopor™ 1500 ist stets höher als das entsprechend immobilisierte Trisopor™ 3000. Die höchste Ausbeute wurde mit der Glutaraldehyd-Methode erreicht. Ein möglicher Grund für diese hohe Immobilisierungsausbeute, könnte die Anlagerung der negativ geladenen Proteine am positiv geladenen Trägermaterial sein, sodass eine gute Ausgangslage zur Ausbildung einer kovalenten Bindung geschaffen wird.

Bei den Proben, die die Umsetzung mit Glutarsäureanhydrid mit anschließender NHS-Aktivierung nutzten, wurde die frühzeitig einsetzende Hydrolyse durch die Reinstwasser-Behandlung der NHS-Beads sehr deutlich beim Vergleich der Färbung 1 zu 2 und 6 zu 5. Die Beads, die nur mit Dioxan behandelt wurden, wiesen eine deutlich höhere Immobilisierungsdichte auf als die entsprechenden mit Reinstwasser behandelten Proben.

An dem Trägermaterial, das mit der basischen Oberflächenbehandlung zur Silanisierung (Epoxydierung) aktiviert wurde (Probe 9), konnte praktisch kein Protein binden. Somit war die Oberfläche auch nach den Waschschritten offensichtlich noch zu basisch, um eine Silanschicht ausbilden zu können.

Durch Zugabe von HCl verschiebt sich das Absorptionsmaximum um 30 nm in den roten Bereich und der Extinktionskoeffizient verdoppelt sich annähernd, sodass die Farbdifferenzen aufgrund der unterschiedlichen Kopplungsdichten deutlicher werden (Abb. 8.10). An dem Farbunterschied (Epoxy



ohne/mit HCl) kann man nun eine leicht unterschiedliche Immobilisierungsdichte erkennen, was auf einen leichten Vorteil bei einer zusätzlichen Säurebehandlung schließen lässt.



Abbildung 8.10: Verschiedene mit Dabsyl-BSA gekoppelte Trisopor™-Proben, im saurem Milieu, Proben analog Abb. 8.9.

Stark adsorptiv gebundene Proteine werden beim Waschprozess nicht entfernt und können somit nicht von den kovalent gebundenen Proteinen unterschieden werden. Daher werden diese bei der Kopplungsdichtebestimmung mitbestimmt. Um die immobilisierte Proteinmenge zu quantifizieren, wurde nachfolgend eine partielle Hydrolyse durchgeführt, sodass anschließend der Überstand im UV/Vis-Spektrometer vermessen werden konnte.

#### 8.2.5 Partielle Hydrolyse der mit Dabsyl-BSA gekoppelten porösen Gläser in der Mikrowelle

Für die partielle Hydrolyse wurde die Mikrowelle Discovery mit Hydrolyseeinheit der Firma CEM verwendet. Die Reaktionskammer der Hydrolyseeinheit mit den kleinen Reaktionsgefäßen kann evakuiert und mit Stickstoff gespült werden (Abb. 8.12). Der Aufbau der Mikrowelle wird in Abbildung 8.11 schematisch dargestellt, wobei hier in dem Reaktionsraum statt der Reaktionskammer für die Hydrolyse ein größeres einzelnes Reaktionsgefäß (Volumen 10 mL) dargestellt ist.

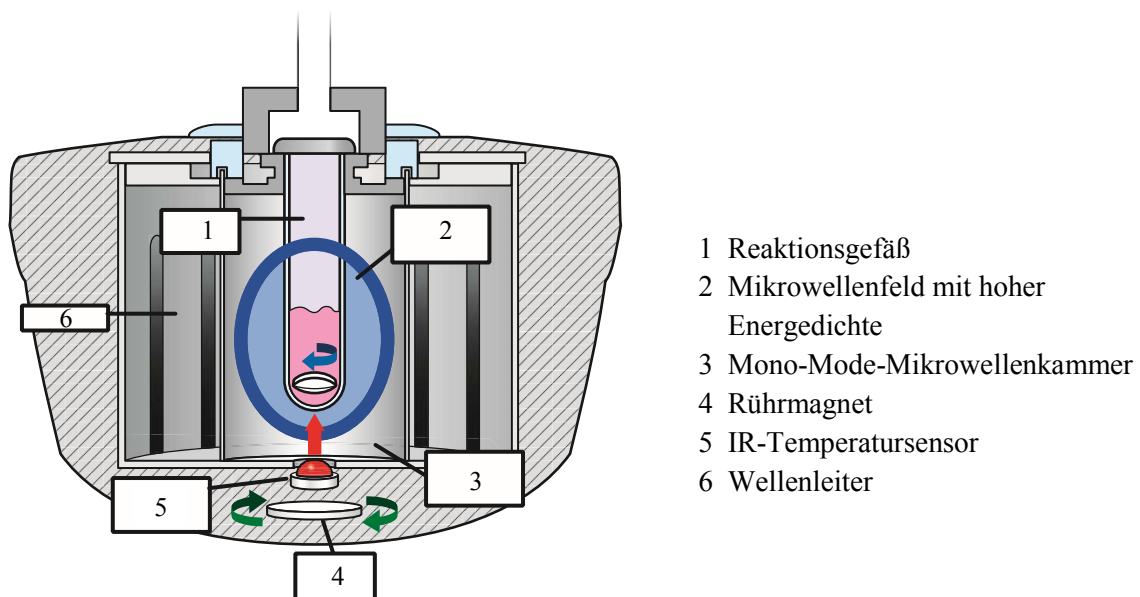


Abbildung 8.11: Funktionsweise des Mikrowellen-Systems Discovery der Firma CEM (mit freundlicher Genehmigung der Firma CEM).



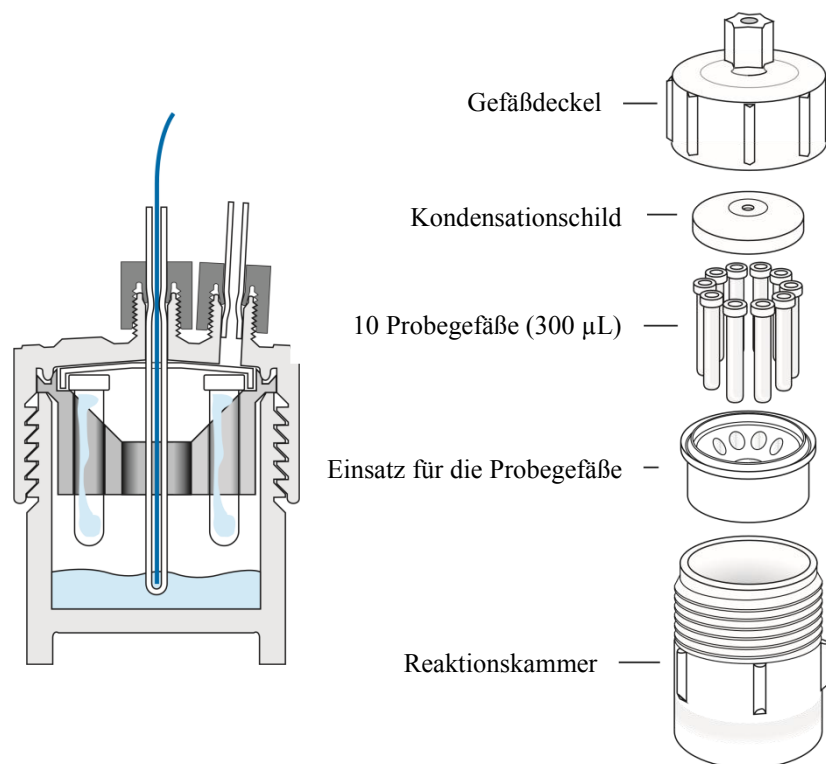


Abbildung 8.12: Aufbau der Reaktionskammer der Firma CEM für die Hydrolyse im Mikrowellen-System Discovery (mit freundlicher Genehmigung der Firma CEM).

### Homogene Energieverteilung innerhalb der Mikrowelle

Um die homogene Energieverteilung der Mikrowelle innerhalb des Reaktionsraums zu überprüfen, wurde die Reaktionskammer mit zehn leeren 300 µL-Röhrchen bestückt und die Kammer mit 10 mL Wasser gefüllt. Nach der Energiezufuhr (Programm: 150 W, 130°C, 10 min hold) haben sich unterschiedliche Wasservolumina in den Röhrchen niedergeschlagen (Abb. 8.13, oben).

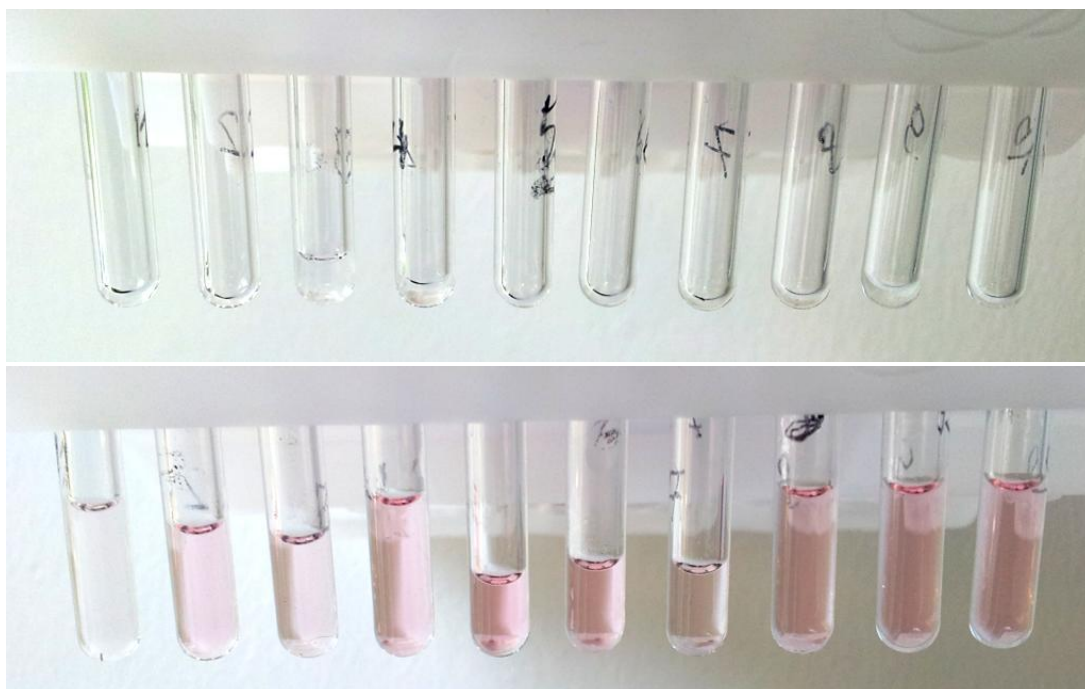


Abbildung 8.13: Wasser (oben) und Dabsyl-BSA (unten) nach Erhitzung in 300 µL-Gasphasenhydrolyse-Reaktionsgefäßen (Mikrowellenmethode: 150 W, 130°C, 10 min hold).

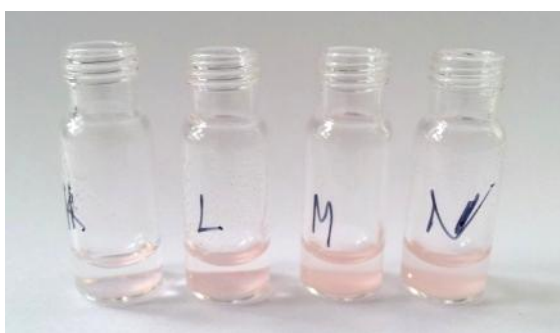
Bei dem zweiten Versuch wurden gleiche Volumina von Dabsyl-BSA in den Hydrolyseröhrchen vorgelegt. Auch bei diesem Experiment schwankten die Probenvolumina nach der Energiezufuhr in den Röhrchen stark und der Farbstoff ist teilweise zerstört worden, was durch eine unterschiedliche Farbsintensität zu erkennen ist (Abb. 8.13, unten). Die von der Firma ausgewiesene homogene Energieverteilung innerhalb des Reaktionsraums konnte somit in den ersten Tests nicht bestätigt werden.

Es können unterschiedlich große Reaktionsgefäße in dieser Mikrowelle benutzt werden (Abb. 8.14, links). Für die Aminosäureanalyse lassen sich jedoch nur die beiden kleineren Reaktionsgefäße nutzen, da sich nur diese gut evakuieren lassen.



*Abbildung 8.14: Reaktionsgefäße für die Mikrowelle mit unterschiedlichen Volumina (von links nach rechts): 300 µL, 1,5 mL und 10 mL (links), Mikrowelleneinsatz der Firma CEM für 1,5 mL-HPLC-Gläschen (rechts).*

Bei der Überprüfung der Energieverteilung bei Verwendung des Einsatzes der Firma CEM für 1,5 mL-HPLC-Gläschen (Abb. 8.14, rechts) blieben die Volumina der Proben in den Gläsern annähernd gleich. Doch die Energieverteilung ist weiterhin so ungleichmäßig, dass der Dabsyl-Farbstoff teilweise zerstört wurde (Abb. 8.15).



*Abbildung 8.15: Dabsyl-BSA-Lösung nach Erhitzung (Mikrowellenmethode: 150 W, 130°C, 10 min hold) in HPLC-Gläschen im Standardeinsatz.*

Um eine gleichmäßigere Energieverteilung zu erreichen, wurde der Halter für die 1,5 mL-HPLC-Gläschen modifiziert. Die Anfertigung erfolgte in der Werkstatt der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Durch zusätzliches Rühren des Wassers im Reaktionsgefäß (10 mL) sollte ein besserer Wärmeausgleich gewährleistet werden. Um dies zu ermöglichen und die Proben im Reaktionsraum in der Höhe der 300 µL-Gasphasenreaktionsgefäße zu positionieren, wurde der Halter (Abb. 8.16, links) oben in die Reaktionskammer eingehängt und die HPLC-Gläschen wurden in die

entsprechenden Aussparungen eingeklemmt. Auch diese Variante führte zur teilweisen Entfärbung des Dabsyl-Farbstoffs, sodass bei der folgenden zweiteiligen Halter-Konstruktion die HPLC-Gläschen soweit in das Wasser im Reaktionsgefäß eintauchen, dass die Probe bis zur Höhe des Flüssigkeitsspiegels (350 µL-Probe im 1,5 mL-HPLC-Gläschen) in das Wasser der Reaktionskammer eintauchen und so von der direkten Mikrowellenbestrahlung abgeschirmt werden (Abb. 8.16 rechts). Im unteren Teil ist eine Aussparung für den Magnetrührstab, im oberen Teil werden die HPLC-Gläschen oben analog wie beim Vorgängermodell eingeklemmt.



Abbildung 8.16: Modifizierte HPLC-Gläschen-Halter für die Hydrolyse-Reaktionskammer der Mikrowelle. Der einteilige Reaktionshalter wird oben eingehängt (links), der zweiteilige wird auf die Füßchenkonstruktion – mit Aussparung für den Magnetrührstab – gestellt (rechts).

### Partielle Hydrolyse der mit Dabsyl-BSA gekoppelten porösen Gläser

In die HPLC-Gläschen werden ca. 20 mg mit Dabsyl-BSA gekoppeltes Trisopor™ mit 300 µL 6 M HCl vorgelegt, in die Reaktionskammer 10 mL Wasser. Die Hydrolyse findet in offenen Gefäßen statt, um eine Evakuierung und Spülung mit Stickstoff zu ermöglichen. Mit gleichmäßiger Energiezufuhr wird möglichen Siedeverzügen vorgebeugt. Bei zu starker Energiezufuhr würde der Farbstoff zerstört werden, daher wurde die Energiezufuhr auf 75 W beschränkt und kontinuierlich die gleiche Leistung zugeführt. Die Zeit der Energiezufuhr betrug 3 Minuten. Das Wasser wurde in der Reaktionskammer mit einem Magnetrührstab gerührt (Modus stirred: hi). Als zusätzliche Sicherheitsgrenzen wurden 6,9 bar als maximaler Druck und die Höchsttemperatur auf 130°C festgesetzt (Tab. 8.2).

Tabelle 8.2: Ergebnisse aus der Teilhydrolyse der mit Dabsyl-BSA gekoppelten porösen Gläser, Auflistung in abnehmender Kopplungsdichte, Proben siehe Abbildung 8.9.

Immobilisierungsmethode	Porendurchmesser [nm]	Extinktion [505 nm]	Kopplungsdichte [mg] pro g Trisopor™	Anteil [%] eines BSA-Monolayer
Glutaraldehyd-Methode (Probe A)	150	0,737 (1:3)*	26,6	7,9
Silanisierung sauer/Epoxy-Methode (Probe 8)	150**	1,165	10,7	2,8
Silanisierung ohne/Epoxy-Methode (Probe 7)	150**	1,018	10,3	2,6
Glutaraldehyd-Methode (Probe D)	300	0,839	7,8	6,4
Bis-NHS-Ester-Methode (Probe B)	150	0,633	6,6	1,7
Anhydrid-NHS-Veresterung (Probe 1)	150	0,603	5,9	1,5
Bis-NHS-Ester-Methode (Probe C)	300	0,338	2,9	2,4
Anhydrid-NHS-Veresterung-Methode (Probe 6)	300	0,276	2,8	2,3
Silanisation basisch/Epoxy-Methode (Probe 9)	150**	0,077	0,8	0,2

\* Verdünnung      \*\* natives Trisopor™, Porengrößen wurden nicht kontrolliert

Die immobilisierte Dabsylmenge wurde über den im sauren erhöhten Extinktionskoeffizient von  $3,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  berechnet.

$$\text{Immobilisierungsrate}_{\text{Dabsyl-BSA}} = \frac{E \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\varepsilon \cdot d \cdot \text{Kopplungsdichte}} \cdot \frac{\text{Probenvolumen}}{\text{Einwaage Support}}$$

*Flecha und Levi* haben für BSA einen mittleren Durchmesser von  $3,39 \pm 0,27 \text{ nm}$  ermittelt [257]. So lässt sich der Platzbedarf eines BSA-Moleküls auf einer Oberfläche grob mit dem Quadrat des Durchmessers ( $1,15 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$ ) abschätzen. Entsprechend der Berechnungsformel des IgG-Monolayers (Kap. 7.6.3)

$$(\text{BSA} - \text{Belegung})_{\text{max}} = \frac{F \cdot \text{Oberfläche des Trägermaterials}}{\text{Flächenbedarf BSA} \cdot N_A} \cdot \text{Molmasse}_{\text{BSA}}$$

werden 388 mg BSA pro g Amino-Trisopor™ 1500 und 122 mg BSA pro g Amino-Trisopor™ 3000 näherungsweise als max. Belegung (BSA-Monolayer) ermittelt. Bei der besten Immobilisierungsmethode, der Glutaraldehydmethode, wird lediglich eine Belegung von 7,9% des BSA-Monolayers erreicht. Aufgrund der eingesetzten Dabsyl-BSA-Menge (0,397 mg Dabsyl-BSA für 10 mg Trägermaterial) ist jedoch höchstens ein 10%-iger Anteil eines BSA-Monolayers auf Trisopor™ 1500 und ein 33%-iger auf Trisopor™ 3000 zu realisieren.

Auch die kleinen 150 nm-Poren bieten ausreichend Platz für die Immobilisierung der Proteine (Dabsyl-BSA). Die höchste Kopplungsdichte mit 26,6 mg von Dabsyl-BSA pro g Trisopor™ 1500 mittels der Glutaraldehyd-Methode entspricht 7,7 mg pro mL Säulenvolumen und liegt in dem Bereich der Kopplungsdichten von kommerziell erhältlichen Affinitätsmaterialien (Tab. 8.3). Die anderen Immobilisierungsmethoden führten zu deutlich kleineren Immobilisierungsdichten.

*Tabelle 8.3: Repräsentative Kopplungsdichte aktivierter und reaktiver Toyopearl®-Trägermaterialien [258, 259].*

Toyopearl® Affinitätsmaterial	Kopplungsdichte BSA [mg] pro mL Affinitätsmaterial
AF-Tresyl-650M	12,4
AF-Formyl-650M	14
AF-Amino-650M	19,2
AF-Carboxy-650M	3,3

Das Verhältnis der Kopplungsdichten von Trisopor™ 1500 und 3000 mittels Glutaraldehydmethode von 34:10 entspricht in etwa dem Oberflächenverhältnis von 32:10 dieser Gläser (nach Herstellerangabe). Die kleinere Porengröße von 150 nm gegenüber 300 nm führt somit zu keiner Verminderung der (relativen) Kopplungsdichte, d. h. das Immobilisierungsverfahren ist nicht diffusionskontrolliert. Bei der Immobilisierungsmethode mittels des Bis-NHS-Ester-Verfahrens ist das Verhältnis deutlich kleiner und liegt bei 23:10 bzw. 21:10. Hier könnte die Hydrolysereaktion in dem kleinporigen Material begünstigt sein, da das in die Poren eingedrungene Wasser nicht schnell genug vollständig entfernt werden kann, sodass anschließend weniger NHS-Gruppen zur Verfügung stehen. Die Silanisierung wurde nur mit Trisopor™ 1500 durchgeführt, sodass kein Vergleich bzgl. der unterschiedlichen Porengröße des verwendeten Glases erfolgen kann.

### 8.2.6 Bestimmung der Dabsyl-BSA-Immobilisierungsdichten verschiedener Trägermaterialien

Um eine breitere Anwendbarkeit dieser Methode für die Affinitätschromatographie zu testen, wurden Dabsyl-Proteine (BSA und IgG) an unterschiedliche Trägermaterialien, wie poröses Glas, Polymethacrylat, Cellulose, Sepharose™, Agarose, Polyacrylamid, Polystyrol und quervernetztes PEG gekoppelt. Je 50 mg Trägermaterial wurde 450 µL 3,66 mg/mL ( $\pm$  1,647 mg) Dabsyl-IgG-Lösung ( $\pm$  1,647 mg) bzw. 300 µL 2,85 mg/mL ( $\pm$  0,855 mg) Dabsyl-BSA-Lösung verwendet. Die entsprechenden Kenngrößen der Trägermaterialien sind in Tabelle 8.4 zusammengestellt.

Tabelle 8.4: Kenngrößen und verwendete Kopplungsmethoden der untersuchten Trägermaterialien.

Grundlage der Matrix	Trägermaterial	Partikelgröße [µm]	Porengröße [nm]	Beladung [µmol/g]	Quellfaktor	max. Druck [bar]	Kopplungsmethode
Poröses Glas	Trisopor™ 1500 Amino	50-100	140-160	243,56			Glutaraldehyd-Methode
	Trisopor™ 3000 Amino	20-50	250-350	95,26			Glutaraldehyd-Methode
Polymethacrylat	Fractogel® EMD-Epoxy	40-90		500-1000	1 g →3,5 mL	20	Epoxy-Methode
	Toyopearl® AF Tresyl- 650M	40-90	100	80	1 g →3,5 mL	3	Tresyl-Kopplung
	Toyopearl® AF Formyl- 650M	40-90	100	40-70		3	via Schiff'sche Base
	Cellufine™-Formyl	125-210		10/mL	0,7-0,8 g $\pm$ 1 mL	< 1	via Schiff'sche Base
Sepharo-se™	NHS-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow	45-165		16-23/mL		1	NHS-Kopplung
Agarose	Pierce NHS-Activated Agarose Dry Resin				1 g $\pm$ 6-7 mL		NHS-Kopplung
Polyacrylamid	UltraLink™ Biosupport	50-80	100	>230/g; >28,75/mL	1 g $\pm$ 7,9-10 mL	6,9	
Polystyrol	TentaGel® M NH2 Monosized Amino	30		200-300			Glutaraldehyd-Methode
Quervernetztes PEG	Aminomethyl ChemMatrix® Harz	35-100		1000			Glutaraldehyd-Methode

Um die Immobilisierungsdichten der Proteine an allen Trägermaterialien vergleichen zu können, wurden zur Immobilisierung bei allen Proben gleiche Volumina der Proteinlösungen mit gleichen Konzentrationen verwendet. Der Immobilisierungserfolg wurde mit der Differenzmethode überprüft (Differenz der Proteinmenge vor und nach der Immobilisierung). Daher wurden Proteinmengen gewählt, die nicht zu maximalen Kopplungsdichten führen können: 30 µL Dabsyl-BSA-Lösung (Kopplungsdichte 2,14) plus 270 µL des für die Immobilisierungsmethode entsprechenden Puffers bzw. 150 µL Dabsyl-IgG-Lösung (Kopplungsdichte 0,37) plus 150 µL des entsprechenden Puffers, d. h.  $c(\text{Dabsyl-BSA}) = 2,02 \text{ mg/mL}$  und  $c(\text{Dabsyl-IgG}) = 5,00 \text{ mg/mL}$ . Abbildung 8.17 zeigt die nach der Immobilisierung gefärbten Trägermaterialien.

Das Trägermaterial ChemMatrix® (PEG) ließ sich nur schlecht zentrifugieren, was zur Beeinträchtigung der Waschschrte führte. Auch störte die gelbe Eigenfärbung des Trägermaterials diese Methode. Eine noch kräftigere Eigenfärbung zeigte Tentagel®. Da Cellufine™-Formyl nass eingewogen wurde und Toyopearl®-Formyl Wasser gezogen hatte, sind die daraus berechneten Kopplungsdichten ungenau und entsprechen daher lediglich Minimalwerten.



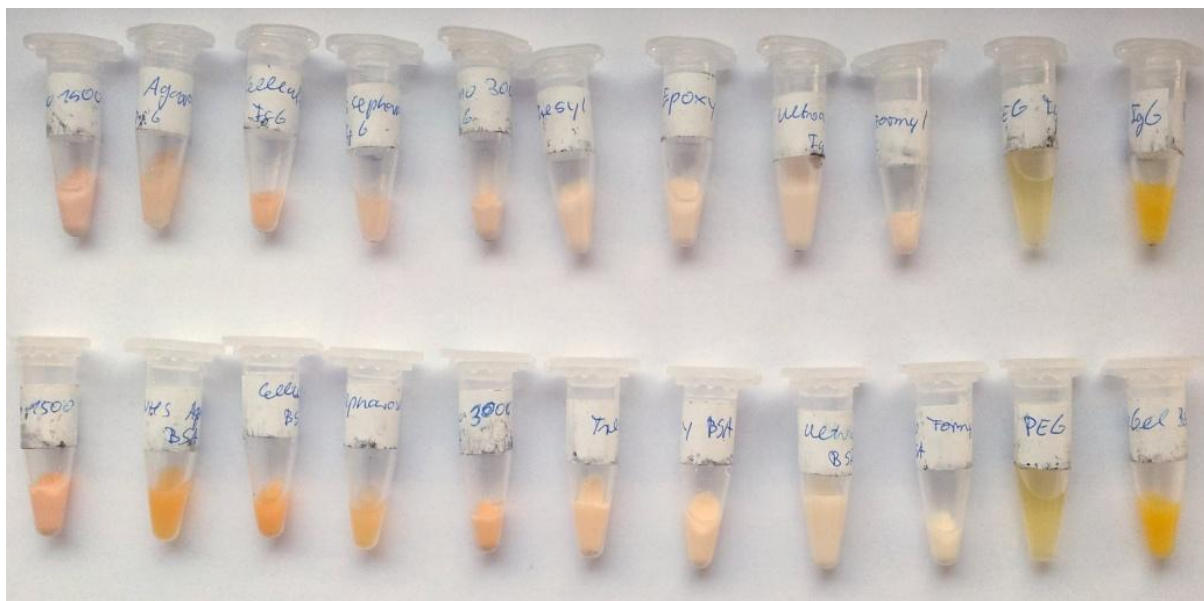


Abbildung 8.17: Mit Dabsyl-IgG (oben) bzw. Dabsyl-BSA (unten) gekoppelte Trägermaterialien (von links nach rechts: Trisopor™ 1500, Agarose, Cellufine™, Sepharose™, Trisopor™ 3000, Toyopearl®-Tresyl, Fractogel® EMD-Epoxy, UltraLink™, Toyopearl®-Formyl, ChemMatrix® (PEG), TentaGel®), pH 7,6.

Auch nach Zugabe von Säure, die zu einer besseren Unterscheidbarkeit der Kopplungsdichte führte (Rotverschiebung und höherer Extinktionskoeffizient), wurde klar, dass die gelbe Färbung der Trägermaterialien ChemMatrix® (PEG) und TentaGel® eine Auswertung mit diesem Verfahren unmöglich macht (Abb. 8.18). Die Trägermaterialien aus Kohlenhydraten führten ebenso zu einer etwas anderen Rotfärbung als die synthetischen Trägermaterialien, was eine schlechtere optische Vergleichbarkeit zur Folge hat.



Abbildung 8.18: Mit Dabsyl-IgG (oben) bzw. Dabsyl-BSA (unten) gekoppelte Trägermaterialien nach Zugabe von 6 M HCl (von links nach rechts: Trisopor™ 1500, Agarose, Cellufine™, Sepharose™, Trisopor™ 3000, Toyopearl®-Tresyl, Fractogel® EMD-Epoxy, UltraLink™, Toyopearl®-Formyl, ChemMatrix® (PEG), TentaGel®).

Die Kopplungsdichten der BSA-Versuchsreihen sind in Tabelle 8.5 aufgeführt. Sie wurden mittels der Differenzmethode nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Kopplungsdichte} = \frac{\left( 2,02 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} - \frac{\text{Extinktion} \cdot 67026 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1,9 \cdot 10^4 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{cm} \cdot 2,14} \right) \cdot 0,3 \text{ mL}}{\text{Einwaage (Trägermaterial)}}$$

Tabelle 8.5: Bestimmung der Dabsyl-BSA-Kopplungsdichte mittels Differenzmethode für die mit Dabsyl-BSA gekoppelten Trägermaterialien.

Trägermaterial	Trägermaterial Einwaage [mg]	E (Dabsyl-BSA), Überstand, 477 nm,	Kopplungsdichte [mg] pro g Matrix
Amino-Trisopor™ 1500, Glutaraldehyd	50,5	0,002	12
Pierce NHS-Activated Agarose Dry Resin	45,3	0,105	12,2
Amino-Trisopor™ 3000, Glutaraldehyd	50,1	0,259	9,5
Cellufine™-Formyl**	111,4**	0,367	> 3,8**
Aminomethyl ChemMatrix® Harz (PEG)*	50,4*	0,621*	-
Toyopearl® -AF-Tresyl-650M	50,1	0,678	5,4
Fractogel® -EMD-Epoxy	51,5	0,718	4,9
UltraLink™ Biosupport	50,7	0,802	4,1
NHS-aktivierte Sepharose™ 4Fast Flow	48,2	0,889	3,5
TentaGel® M NH2, Monosized Amino*	50,4*	0,927*	-
Toyopearl® -AF-Formyl-650M**	100,7**	0,98	> 1,2**

\* Diese Trägermaterialien haben eine gelbe Farbe, sodass die UV-Messung stark fehlerbehaftet ist.

\*\* Cellufine™ wurde nass eingewogen, Toyopearl®-Formyl hatte Wasser gezogen (klumpig).

Die Immobilisierungsdichten der IgG-Reihe sind in Tabelle 8.6 aufgeführt und berechnen sich analog:

$$\text{Kopplungsdichte} = \frac{\left( 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} - \frac{\text{Extinktion} \cdot 145066 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1,9 \cdot 10^4 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{cm} \cdot 0,37} \right) \cdot 0,3 \text{ mL}}{\text{Einwaage (Trägermaterial)}}$$

Tabelle 8.6: Bestimmung der Dabsyl-IgG Kopplungsdichte mittels Differenzmethode für die mit Dabsyl-IgG gekoppelten Trägermaterialien.

Trägermaterial	Trägermaterial Einwaage [mg]	E (Dabsyl-IgG), Überstand, 477 nm,	Kopplungsdichte [mg] pro g Matrix
Amino-Trisopor™ 1500 (Glutaraldehyd)	50,5	0,008	28,7
Pierce NHS-Activated, Agarose Dry Resin	48,9	0,022	27,9
Amino-Trisopor™ 3000 (Glutaraldehyd)	50,3	0,087	19,1
Cellufine™-Formyl**	86,2**	0,067	12,6**
Aminomethyl ChemMatrix® Harz (PEG)*	49,9*	0,158*	10,5
Toyopearl® -AF-Tresyl-650M	50,7	0,08	19,8
Fractogel® -EMD-Epoxy	50,3	0,102	17,3
UltraLink™ Biosupport	50,7	trüb	-
NHS-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow	49,9	0,138	12,9
TentaGel® M NH2 Monosized Amino*	50,1*	0,221*	-
Toyopearl® -AF-Formyl-650M**	96,6**	0,151	5,9**

\* Diese Trägermaterialien haben eine gelbe Farbe, sodass die UV-Messung stark fehlerbehaftet ist.

\*\* Cellufine™ wurde nass eingewogen, Toyopearl®-Formyl hatte Wasser gezogen (klumpig).

Um die Kopplungsdichte des Trägermaterials quantitativ über die Dabsyl-Methode zu bestimmen, wurden die Proben partiell hydrolysiert (3 min in der Mikrowelle mit 75 W, Kap. 5.5.6). Unter den Bedingungen der Teilhydrolyse verkohlten die kohlenhydratbasierten Trägermaterialien (Abb. 8.19). Die Teilhydrolysen der mit Dabsyl-IgG gekoppelten Trägermaterialien führten bei allen Proben zur fast vollständigen Entfärbung. Folglich ist eine quantitative Auswertung dieser Proben mittels UV/Vis-Spektroskopie nicht möglich.



Abbildung 8.19: Teilhydrolyse der zuvor mit Dabsyl-BSA immobilisierten Trägermaterialien.

Für dieses quantitative Verfahren sind somit nur synthetische Trägermaterialien auf Basis von Polymethacrylat und porösem Glas geeignet. Die aus den Extinktionen (E) resultierenden Kopplungsdichten sind in Tabelle 8.7 den Kopplungsdichten aus der Differenzmethode gegenübergestellt.

Tabelle 8.7: Dabsyl-BSA-Kopplungsdichte, berechnet über Teilhydrolyse und Differenzmethode.

Trägermaterial	Matrix Einwaage [mg]	Teilhydrolyse E (505 nm) (1:1 verd.)	Kopplungsdichte [mg/g] über Teilhydrolyse	Kopplungsdichte [mg/g] über Differenzmethode
Amino-Trisopor™ 1500 (Glutaraldehyd)	50,5	0,934	4,7	12,0
Pierce NHS-Activated Agarose Dry Resin	45,3	-	-	12,2
Amino-Trisopor™ 3000 (Glutaraldehyd)	50,1	0,677	3,4	9,5
Cellufine™-Formyl**	111,4	-	-	> 3,8**
Aminomethyl ChemMatrix Harz (PEG)*	50,4	0,621*	-*	-*
Toyopearl® -AF-Tresyl-650M	50,1	0,729	3,7	5,4
Fractogel® -EMD-Epoxy	51,5	0,492	2,4	4,9
UltraLink™ Biosupport	50,7	0,802*	4,0*	4,1
NHS-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow	48,2	-	-	3,5
TentaGel® M NH2 Monosized Amino*	50,4	0,927*	-*	-*
Toyopearl® -AF-Formyl-650M**	100,7	0,109	0,3	> 1,2**

\*Messungen sind entweder durch Eigenfärbung oder durch zu starke Trübung nicht zur weiteren Berechnung geeignet.

Die Kopplungsdichten (Dabsyl-BSA), die mittels Differenzmethode berechnet wurden, sind stets deutlich höher als die über die AAAA ermittelte. Ein Teil der am Trägermaterial adsorbierten Proteine könnte erst bei den nachgeschalteten Waschritten entfernt worden sein. Daher scheint die Differenzmessung, die nur den Überstand zur Auswertung nutzt, keine exakte Methode zur Bestimmung der Immobilisierungsdichte zu sein. Ein weiterer prinzipieller Nachteil der Differenzmessung ist, dass bei Verwendung von hochkonzentrierten Proteinmengen, von denen nur ein kleiner Prozentsatz am Affinitätsmaterial gebunden wird, die Ungenauigkeit bei der Differenzmessung zwischen Anfangskonzentration und Konzentration des Überstands nach der Immobilisierung hoch ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Dabsylmethode – ohne anschließende Teilhydrolyse – eher für eine erste Einschätzung der Immobilisierungsdichte eignet, da so auch Aussagen über die



Immobilisierungsdichte z. B. der kohlenhydratbasierten Trägermaterialien erfolgen kann. Diese Farbauswertung sollte im sauren Milieu erfolgen, da hier aufgrund der Rotverschiebung und des höheren Extinktionskoeffizienten eine genauere Differenzierung möglich ist. Aussagen über den Immobilisierungserfolg an Trägermaterialien mit starker Eigenfärbung können jedoch nicht getroffen werden. Die anschließende Teilhydrolyse ermöglicht eine genauere Quantifizierung. Jedoch ist diese nicht für alle Trägermaterialien geeignet, da durch die Energiezufuhr eine teilweise Zersetzung der kohlenwasserstoffbasierten Trägermaterialien erfolgt.

Um eine allgemeiner anwendbare und dennoch leicht durchzuführende Proteinbestimmungsmethode für Trägermaterialien zu entwickeln, wurde eine vereinfachte Aminosäureanalyse des Trägermaterials als grundlegende Idee verfolgt.

### **8.3 Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA)**

#### **8.3.1 Prinzip des AAAA-Verfahrens**

Um Proteinbestimmungen an synthetischen Affinitätsmaterialien und an poröse Gläser quantitativ zu bestimmen, wurde ein Verfahren mit vollständiger Proteinhydrolyse entwickelt (Kap. 4.2). Ziel war es eine einfache, präzise Methode zur Aminosäurebestimmung ohne Vor- bzw. Nachsäulenderivatisierung wie bei der klassischen Aminosäureanalyse (amino acid analysis, AAA) zu entwickeln. Dafür verzichtet dieses Verfahren auf die Bestimmung einer Vielzahl von Aminosäuren und beschränkt sich lediglich auf die aromatischen, nicht sehr reaktiven Aminosäuren Tyr und Phe. Dieses Verfahren, das ich als Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA) bezeichnet habe, nutzt als internen Standard zwei seltene Aminosäure-Derivate. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektion bei 215 nm [260]. Die Methode des internen Standards ist in der MS-Analytik eine übliche Vorgehensweise, um via Isotopenmarkierung zur Quantifizierung zu gelangen. Der offensichtliche Nachteil chemisch verschiedene Derivate einzusetzen, ist ihr potentiell unterschiedliches Verhalten bei der Hydrolyse. Um dieses Risiko klein zu halten, wurden chemisch sehr ähnliche Derivate genutzt. Das Verfahren wurde zunächst mit homogenen, flüssigen Proben getestet und validiert.

#### **8.3.2 Auswahl des internen Standards**

Als interner Standard wurden anfänglich die entsprechenden homologen Aminosäuren gewählt (Abb. 8.20), die den natürlichen Aminosäuren chemisch sehr ähnlich sind. Um Nebenreaktionen während der Hydrolyse zu unterbinden, werden in der Regel Additive, meist Phenol, verwendet. Zu Beginn wurden Blindproben mit und ohne Zusatz von Phenol nach einem definierten Hydrolyseprotokoll hydrolysiert und mittels des entwickelten HPLC-Protokolls analysiert (Kap. 5.7.2). Die Hydrolysedauer in der Mikrowelle betrug 20 min (20 min hold time). Bei einer zweiten phenolhaltigen Probe wurde sie um 5 Minuten verlängert (hold time 25 min). Wie in Abbildung 8.21 zu sehen ist, konnte Phenol bei allen Proben nachgewiesen werden. Ob die Kontamination während der Hydrolyse oder bei der anschließenden Evaporierung erfolgte, wurde nicht untersucht.

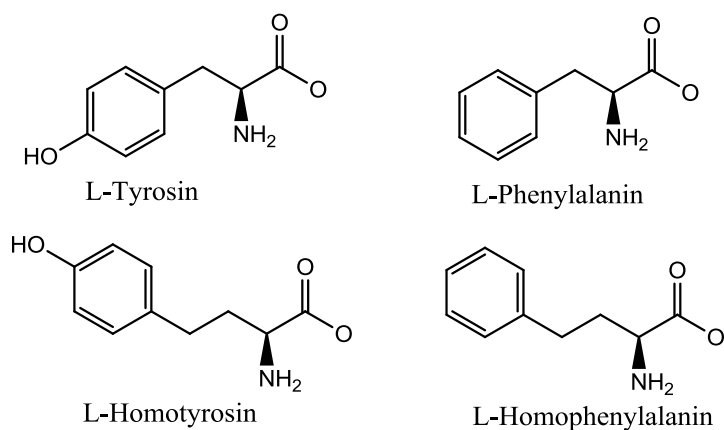


Abbildung 8.20: Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe, F), L-Tyrosin (Tyr, Y) und ihre entsprechenden internen Standards, L-Homophenylalanin (HPhe) und L-Homotyrosin (HTyr).

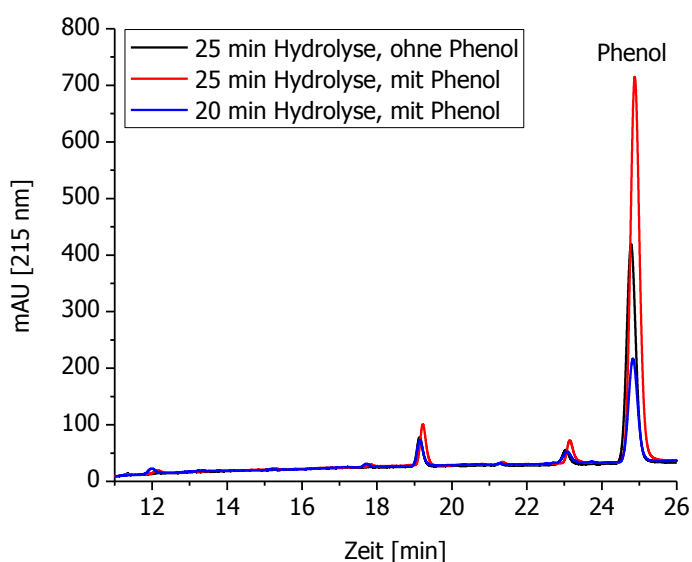


Abbildung 8.21: Chromatogramme der Hydrolyse-Blindproben mit und ohne Zusatz von Phenol, Hydrolysedauer 20 bzw. 25 min.

Das Chromatogramm der Aminosäuren des internen Standards mit dem zugesetzten Additiv Phenol ist in Abbildung 8.22 zu sehen. 17 von 20 Aminosäuren sind bei dieser Trennung in diesem Zeitfenster nicht sichtbar, da diese auf der C18-Säule nicht retardieren und somit bereits ungetrennt im Anfangspeak eluieren.

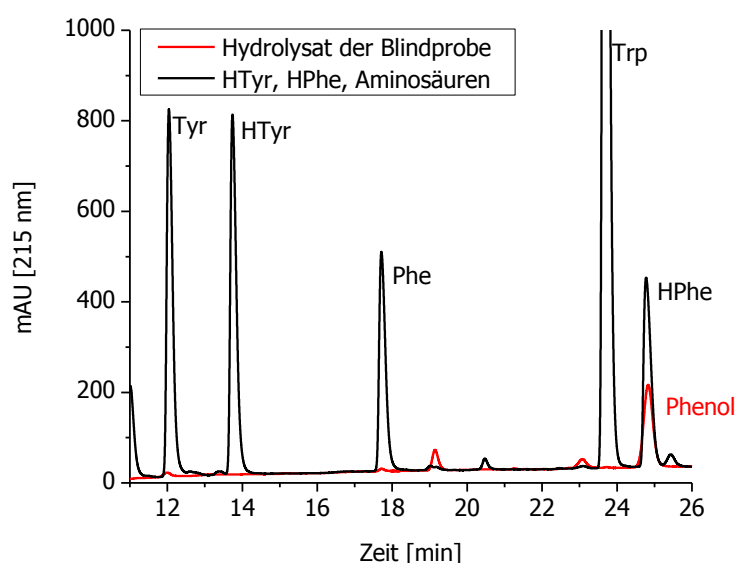


Abbildung 8.22: Chromatogramme von einer Blindprobe nach 20 min Hydrolyse mit Phenol und einer Aminosäuremischung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl unter Zusatz von 1,25 mM Tryptophan, 2,5 mM Glutamin und 2,5 mM Asparagin sowie des internen Standards HTyr und HPhe und des Additivs Phenol (17 von 20 Aminosäuren sind bei dieser Trennung in diesem Zeitfenster nicht sichtbar).

Da die Retentionszeiten von Homophenylalanin und Phenol übereinstimmen, wurde für Phenylalanin der interne Standard gewechselt und das entsprechende Fluorderivat verwendet (Abb. 8.23).

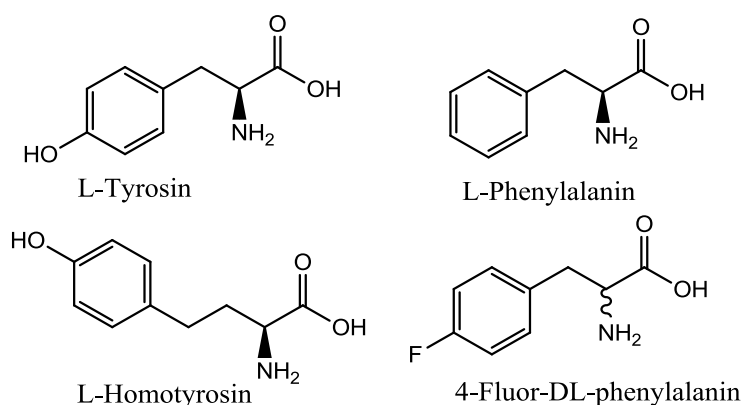


Abbildung 8.23: L-Phenylalanin (Phe, F) und L-Tyrosin (Tyr, Y) und ihre jeweiligen internen Standards, 4-Fluor-DL-phenylalanin (FPhe) und L-Homotyrosin (HTyr).

Bei der Hydrolyse des Aminosäurestandards zusammen mit den internen Standards entsteht ein Produkt mit einer nur wenig kleineren Retentionszeit als der interne Fluor-Phe-Standard, erkennbar an der zu Beginn des Peaks auftretenden Schulter (Abb. 8.24).

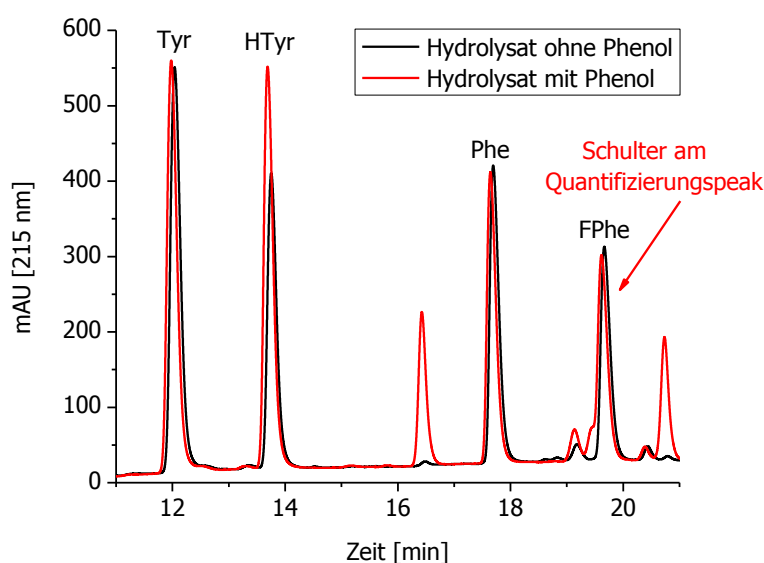


Abbildung 8.24: Chromatogramm nach der Hydrolyse des Aminosäurestandards und der internen Standards mit und ohne Zusatz von Phenol bei der Hydrolyse (hold-time 20 min).

Die Hydrolysen der Aminosäuren zusammen mit den internen Standards wurden ebenfalls mit 25-minütiger Hydrolyse (statt 20 min) durchgeführt. Dabei konnte die fortschreitende Entwicklung des Produkts, das die Schulter bildete, beobachtet werden, da diese an Höhe gewann (Abb. 8.25).

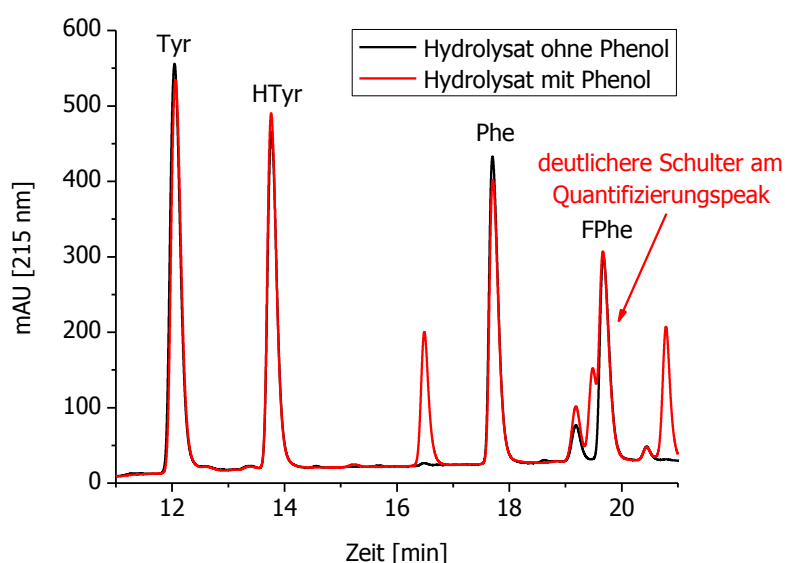


Abbildung 8.25: Chromatogramm nach der Hydrolyse der Aminosäuren und der internen Standards mit und ohne Zusatz von Phenol bei der Hydrolyse (hold-time 25 min).

Aufgrund der auftretenden Schulter während der Hydrolyse bei Verwendung des Additivs Phenol wird bei diesem Verfahren auf das Additiv bei der Hydrolyse verzichtet. Wie in Tabelle 4.4 aufgeführt reagiert Phe in der Regel nicht während der Hydrolyse. Die wahrscheinlichste Reaktion von Tyr ist die Halogenierung – bei Verwendung von Salzsäure also die Chlorierung. Unter der Annahme, dass die Chlorierung im gleichen Maße bei Tyrosin wie beim homologen Tyr-Standard erfolgt, können somit auftretende Verluste von Tyrosin durch entsprechende Verluste des homologen Tyrosinstandards korrigiert werden. Die Hydrolysezeit in der Mikrowelle wurde auf 20 min festgelegt.

### 8.3.3 Das AAAA-Verfahren

Abbildung 8.26 zeigt ein Chromatogramm einer Standardlösung von Aminosäuren (Standardreferenzmaterial NIST 2389a), ergänzt mit 1,25 mM Tryptophan, 2,5 mM Glutamin und 2,5 mM Asparagin, um die 20 traditionellen proteinogenen Aminosäuren zu untersuchen. Die kleine Basisliniendrift bei etwa 10 min wird durch die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten von TFA in Wasser und Acetonitril verursacht [260]. Nur die drei aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan) werden in der Zeit zwischen 8 und 28 min detektiert. 17 der 20 Aminosäuren sind in diesem Zeitraum nicht sichtbar, da sie an der RP-HPLC-Säule nicht zurückgehalten und daher alle ungetrennt im Anfangspeak erscheinen. Die Extinktion wurde bei 215 nm gemessen. Da Tryptophan bei der sauren Hydrolyse meist vollständig zerstört wird, wird es bei dieser Methode nicht weiter untersucht. Dennoch kann es unter den gleichen Bedingungen ohne Schwierigkeiten detektiert werden.

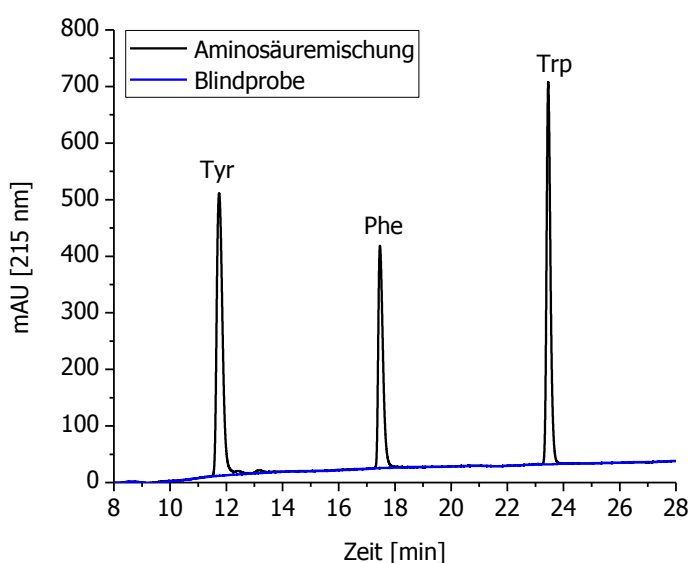


Abbildung 8.26: Chromatogramme von einer Aminosäuremischung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl unter Zusatz von 1,25 mM Tryptophan, 2,5 mM Glutamin und 2,5 mM Asparagin (17 von 20 Aminosäuren sind bei dieser Trennung in diesem Zeitfenster nicht sichtbar) und einer Blindprobe (blau).

Üblicherweise werden die Konzentrationen des internen Standards und die des Analyten ähnlich gewählt. Da bei der Hydrolyse, die für die Konzentrationsbestimmung der Peptid- bzw. Proteinproben notwendig ist, zusätzliche kleine Peaks auftreten, ist eine relativ hohe Konzentration (25  $\mu$ M) der internen Standards vorteilhaft, um Fehler bei der Flächenbestimmung des internen Standards zu minimieren. Für die Probe, würden ungefähr 0,1 mM der jeweiligen Aminosäure eine geeignete Konzentration sein, für Proteine z. B. BSA, etwa 5  $\mu$ M oder 0,3 g/L. Ein Standardprotokoll könnte wie folgt aussehen: 5  $\mu$ L interner Standard (1 mM) und 20  $\mu$ L Proteinprobe (5  $\mu$ M oder 0,3 g/L) werden zu 200  $\mu$ L 6 M HCl gegeben. Nach Hydrolyse und Eindampfen der Probe wird das Pellet in 200  $\mu$ L Wasser gelöst. Die Analyse wird mit einer RP-Säule und einem UV-Detektor (215 nm) an einem HPLC-System durchgeführt. Die Aminosäurekonzentration wird durch das Verhältnis der Peakflächen des Analyten zum internen Standard bestimmt, wobei die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten berücksichtigt werden müssen. Die Protein- oder Peptidkonzentration wird unter Verwendung des von der Sequenz abgeleiteten Aminosäuregehalts oder von einem mittleren Gehalt von Tyr und Phe in einer komplexen Probe berechnet. Abbildung 8.27 zeigt das Chromatogramm des Aminosäurestandards und der beiden internen Standards, Homotyrosin und 4-Fluorphenylalanin, ohne vorherige Hydrolyse. Bei dem kleinen Peak neben FPhe handelt es sich um eine Verunreinigung des kommerziellen FPhe.

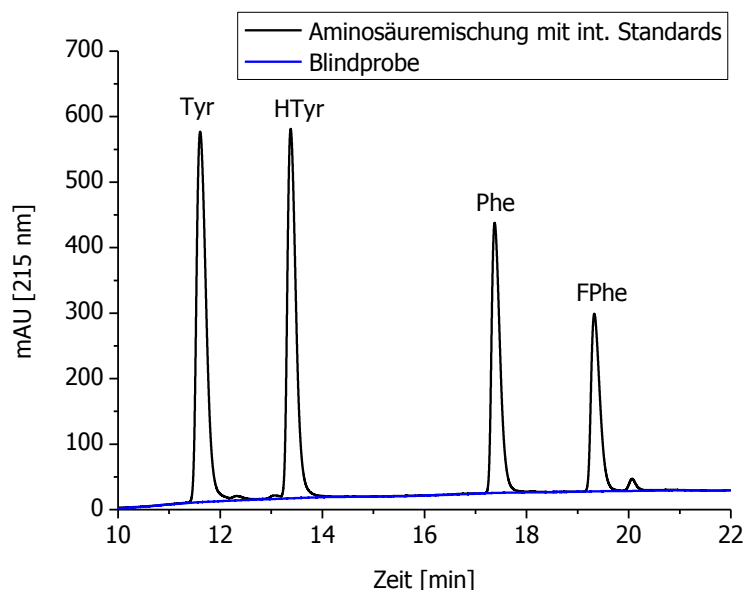


Abbildung 8.27: Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl mit den zugesetzten internen Standards Homotyrosin (HTyr) und 4-Fluorphenylalanin (FPhe) sowie einer Blindprobe (blau).

Da die Extinktionskoeffizienten des internen Standards und der Aminosäure nicht identisch sind, wurden Proportionalitätsfaktoren bestimmt. Die Faktoren sind für Phe/FPhe  $0,882 \pm 0,027$  ( $n = 5$ ) und für Tyr/HTyr  $0,673 \pm 0,010$  ( $n = 5$ ) (Anhang Tab. A1). Bzgl. der Reinheit wurden die internen Standards nicht korrigiert.

Für die Kalibriergerade wurden Verdünnungen vom Aminosäure-NIST-Standard mit Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  analysiert. Die doppellogarithmische Darstellung ist in Abbildung 8.28 zu sehen.

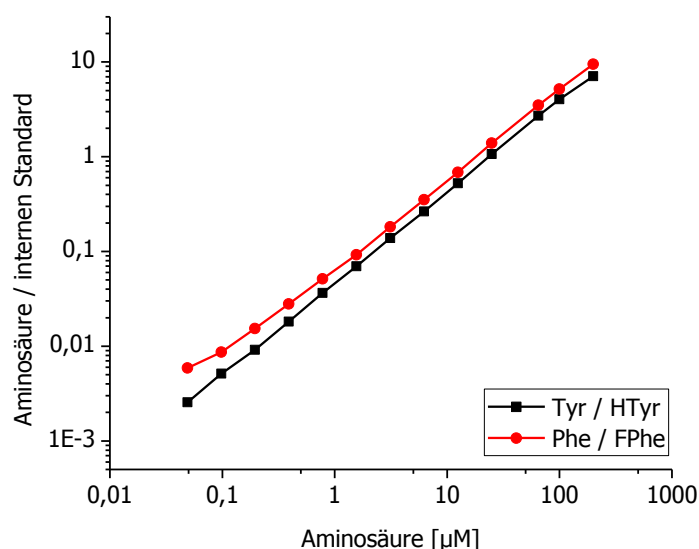


Abbildung 8.28: Kalibriergerade von Phe und Tyr bei 215 nm in einer doppellogarithmischen Darstellung. Die Ergebnisse wurden auf den entsprechenden internen Standard normiert.

Die Nachweisgrenze ist bei 0,05 µM (~ 10 µg/L) für Phe und 0,05 µM (~ 10 µg/L) bei Tyr. Der lineare Bereich liegt zwischen 0,1 µM und 100 µM, sodass durch Verdünnung der Probe in der Regel eine gut messbare Probenkonzentration erhalten werden kann.

### 8.3.4 Validierung des AAAA-Verfahrens zur Proteinbestimmung

Um das vollständige Verfahren incl. Hydrolyse zu validieren, wurde eine Probe des Proteins Rinderserumalbumin (NIST SRM Referenzmaterial 927e, BSA) bekannter Konzentration bestimmt. Im ersten Schritt wurde die Probe zusammen mit dem internen Standard konventionell in einem Hydrolyserohr vollständig hydrolysiert und anschließend entsprechend des in Kapitel 5.7.2 aufgeführten Protokolls analysiert. Das Chromatogramm der Probe (hydrolysiertes BSA) ist in Abbildung 8.29 zu sehen.

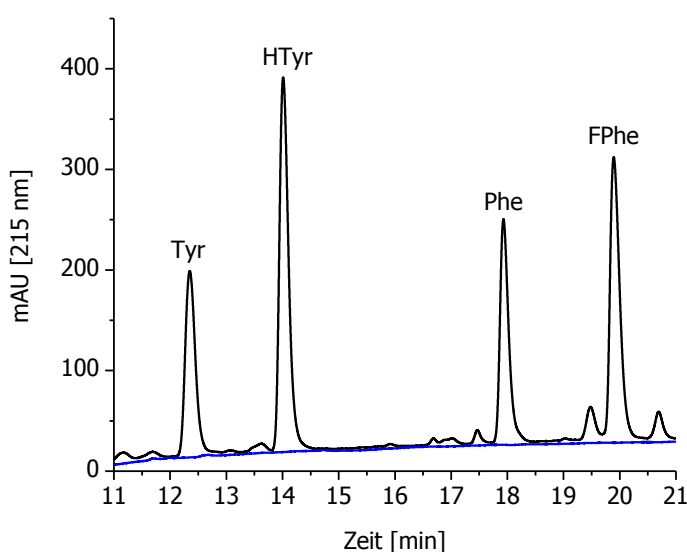


Abbildung 8.29: Chromatogramm von hydrolysiertem Serumalbumin (NIST SRM 927e, zertifiziertes Referenzmaterial) plus internen Standard sowie von einer Blindprobe (blau).

Bei einfachen und reinen Proben scheint die Standard-Peakintegration des HPLC-Systems ausreichend. Durch die Hydrolyse entstehen jedoch zusätzliche kleine Peaks durch unbekannte Verunreinigungen, die mit den Detektionspeaks teilweise überlappen. Da eine UV-Detektion eine selektive Auswertung der Daten bei einer Peaküberlagerung nur mit komplexen Methoden ermöglicht, wurde ein mathematisches Näherungsverfahren benutzt, dass die Werte der Peakflächen der Nebenprodukte von den Werten der Peakflächen der Hauptpeaks subtrahiert, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten. Da die Peaks nicht vollständig symmetrisch sind, wurde die asymmetrische Doppel-Sigmoidalfunktion "Asym 2 Sig" (Software Origin®) verwendet. Die Formel der Näherung lautet:

$$y = y_0 + A \cdot \frac{1}{1 + e^{\frac{x - x_c + w_1/2}{w_2}}} \cdot \left( 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{x - x_c - w_1/2}{w_3}}} \right)$$

Dabei beschreibt  $y_0$  den Versatz in y-Richtung,  $x_c$  den Mittelpunkt (Maximum) des Peaks,  $w_1$  die volle Breite des halben Maximums,  $w_2$  und  $w_3$  sind die Varianzen der jeweiligen Seite. Dieser Ansatz ermöglicht auch die Einrichtung einer robusten Grundlinie.

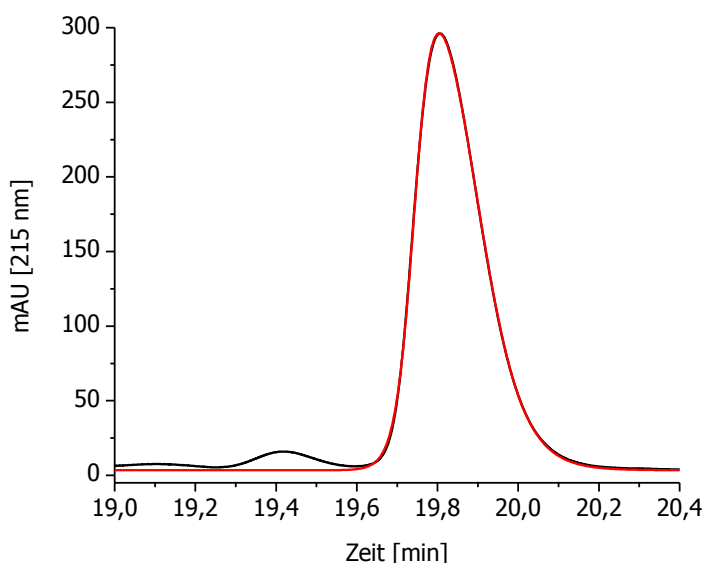


Abbildung 8.30: Der gemessene Peak von FPhe von hydrolysiertem Serumalbumin (NIST 927e, zertifiziertes Referenzmaterial) und der angepasste Peak mit dem Asym2Sig Modell.

In Tabelle 8.8 wurden die aus den AAAA-Messungen berechneten Konzentrationen mit ihren absoluten und relativen Standardabweichungen, sowie die daraus resultierende relative BSA-Wiederfindung für die unterschiedlichen Detektionen aufgeführt (Anhang Tab. A2). Die Berechnung erfolgt mit folgenden Formeln:

$$\text{Konz (BSA)}[\text{mM}] = \frac{\varepsilon \cdot \text{Fl che(AS)}}{\text{Fl che(HAS)} \cdot \text{Anzahl AS}} \cdot 0,025\text{mM} \cdot \text{Vorverd.}$$

$$\text{Konz (BSA)} \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{\varepsilon \cdot \text{Fl che(AS)}}{\text{Fl che(HAS)} \cdot \text{Anzahl AS}} \cdot 0,025\text{mM} \cdot \text{Vorverd.} \cdot 66,3981 \frac{\text{g}}{\text{mmol}}$$

mit:

$$\varepsilon = \frac{\text{Fl che(int. Std. Standard)}}{\text{Fl che(AS}_{\text{standard}})}$$

(bei gleicher Konzentration des internen Standards und des Aminosäurestandards)

Tabelle 8.8: Gemessene BSA-Konzentration der BSA-NIST-Lösung, deren empirische Standardabweichung  $s$  ( $n=7$ ), relative Standardabweichung  $s_{\text{rel}}$  und die Wiederfindung (getrennte Berechnungen basierend auf den Bestimmungen von Tyr und Phe).

Basis zur Berechnung	BSA [g/L]	$s$ [g/L]	$s_{\text{rel}}$ [%]	Wiederfindung [%]
Tyr (215 nm)	67,87	3,16	4,66	100,7
Phe (215 nm)	70,36	3,79	5,39	104,4

Es gibt zwei Kriterien, um die Präzision bzw. die Richtigkeit eines Verfahrens zu beurteilen: Die relative Standardabweichung und die Wiederfindung von BSA. Für beide liefert das AAAA-Verfahren sehr gute Werte. Die zertifizierte BSA-Konzentration der Lösung von NIST-BSA basierend auf einer Aminosäureanalyse beträgt  $67,38 \pm 1,38$  g/L. Die Berechnung basierend auf der AAAA-Messung zusammen mit der Information über die bekannten Zusammensetzung von BSA (20 Tyr und 27 Phe, 66398,1 g/mol), ergab eine Konzentration von  $70,36 \pm 3,79$  g/L BSA berechnet aus der Phe-Konzentration und  $67,87 \pm 3,16$  g/L auf Basis der Tyr-Konzentration. Die Wiederfindung betrug  $104,4 \pm 5,6\%$ , bezogen auf Phe (215 nm) und  $100,7 \pm 4,6\%$ , bezogen auf Tyr (215 nm).



Die Bestimmungsgrenze für BSA kann rechnerisch von der Bestimmungsgrenze von Phe bzw. Tyr abgeleitet werden:

$$\text{Konz (BSA)} = \frac{0,1 \text{ M}}{\text{Anzahl AS}} \cdot 66398,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

für Phe: 2,21 mg/L BSA, für Tyr: 3,16 mg/L BSA (Verdünnungsfaktor 10, aufgrund des Protokolls)

Experimentell wurde für die Abschätzung der Bestimmungsgrenze ebenfalls zertifiziertes Referenzmaterial von Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die Abschätzung basiert auf dem Phenylalanin-peak (Abb. 8.31).

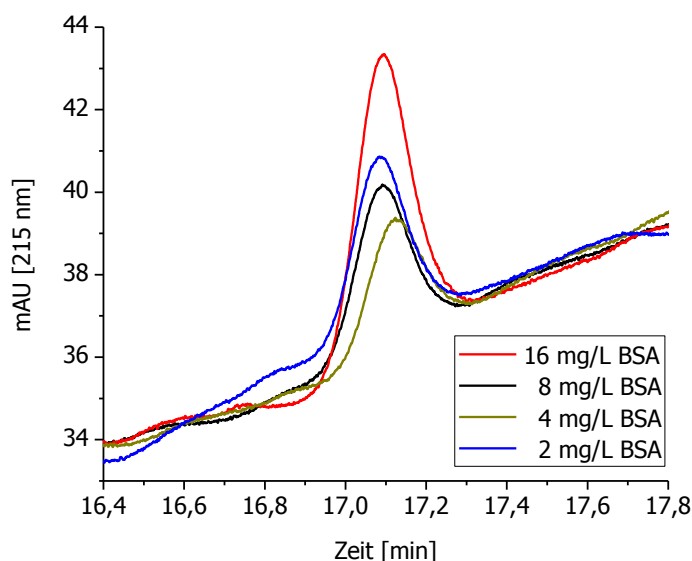


Abbildung 8.31: Phe-Peaks der Chromatogramme von hydrolysierten Serumalbumin (NIST SRM 927e, zertifiziertes Referenzmaterial) zur Bestimmung der Nachweisgrenze.

Der Phe-Peak des Chromatogramms der BSA-Probe mit einer Konzentration von 16 mg/L zeigt eine signifikante Zunahme der Peakfläche. Die Signale mit Konzentrationen von 8 mg/L und niedriger erzeugen etwa gleichgroße Peakflächen. Die Ursache lag wahrscheinlich an der vorangegangenen Hydrolyse oder Evaporierung, bei der ein möglicher Stoffübertrag („Carryover“) erfolgen konnte. Somit ist voraussichtlich eine Verbesserung der Nachweisgrenze durch Optimierung des Hydrolyseschritts möglich.

### 8.3.5 Peptid-Analyse am Beispiel von Hepcidin-25

Das AAAA-Verfahren kann auch verwendet werden, um die Konzentration von Peptidlösungen zu überprüfen, sofern das Peptid mindestens ein Tyrosin oder Phenylalanin pro Molekül besitzt. Mit bekannter Sequenz oder zumindest der Aminosäurezusammensetzung, kann somit die Konzentration der Peptidlösung berechnet werden.

Abbildung 8.32 zeigt das Chromatogramm einer hydrolysierten Probe von Hepcidin-25. Die Sequenz von Hepcidin enthält kein Tyrosin, sondern lediglich zwei Moleküle Phenylalanin, daher ist kein Tyr-Peak auszumachen. Da synthetische Peptide oft erhebliche Mengen an Trifluoracetat, andere Salzionen oder Wasser enthalten, ist dies eine geeignete Quantifizierungsmethode.

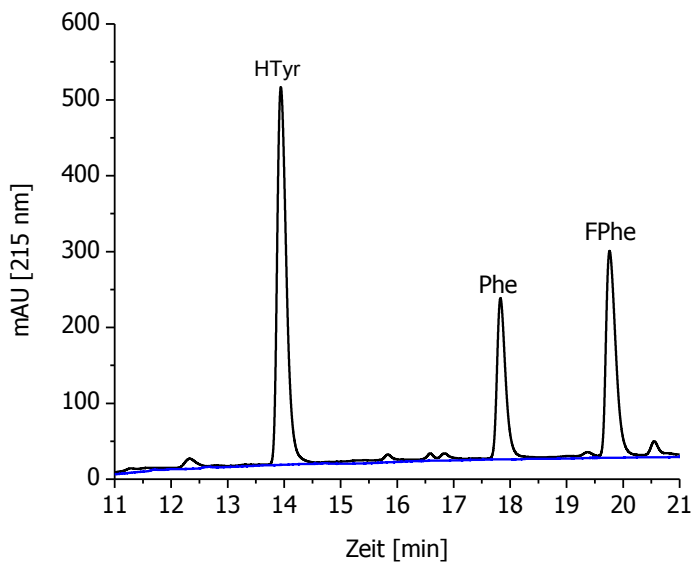


Abbildung 8.32: Chromatogramm von hydrolysierten Hepcidin-25 plus internen Standard sowie einer Blindprobe (blau).

### 8.3.6 Protein-Analyse komplexer Proben

Das vorgestellte Verfahren eignet sich auch für die Proteinbestimmung komplexer Proben, wie Blutseren, Plasma oder Nahrungsmittelproben. Da diese eine Mischung vieler Proteine enthalten, kann die Konzentration nicht einem einzelnen Protein mit bekannter Sequenz zugeschrieben werden. Um diese Methode zu verwenden, wird ein Protein bzw. ein Proteingemisch bekannter Konzentration als Referenz gewählt und diese mit den Proben verglichen. Der Gehalt an Phenylalanin oder Tyrosin der Referenzprobe sollte repräsentativ für die anderen Proben sein. Als Proben wurden Mausserum und Humanserum (Abb. 8.33) hydrolysiert und analysiert, um zu untersuchen, ob die Peaks unter diesen Bedingungen basisliniengetrennt werden. Zusätzlich wurde Rinder-IgG und Magermilch (Abb. 8.34) untersucht. Bei allen Proben gab es keine offensichtlichen Störpeaks in dem jeweiligen Detektionsfenster.

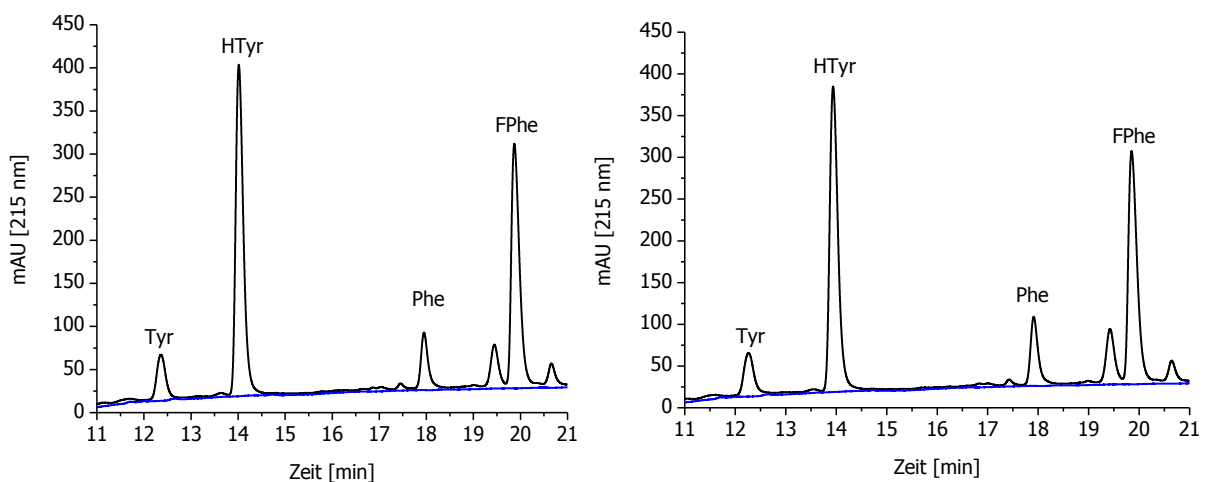


Abbildung 8.33: Chromatogramme von hydrolysiertem Mausserum (links) und von hydrolysiertem Serum menschlichen Ursprungs (rechts) sowie jeweils einer Blindprobe (blau).

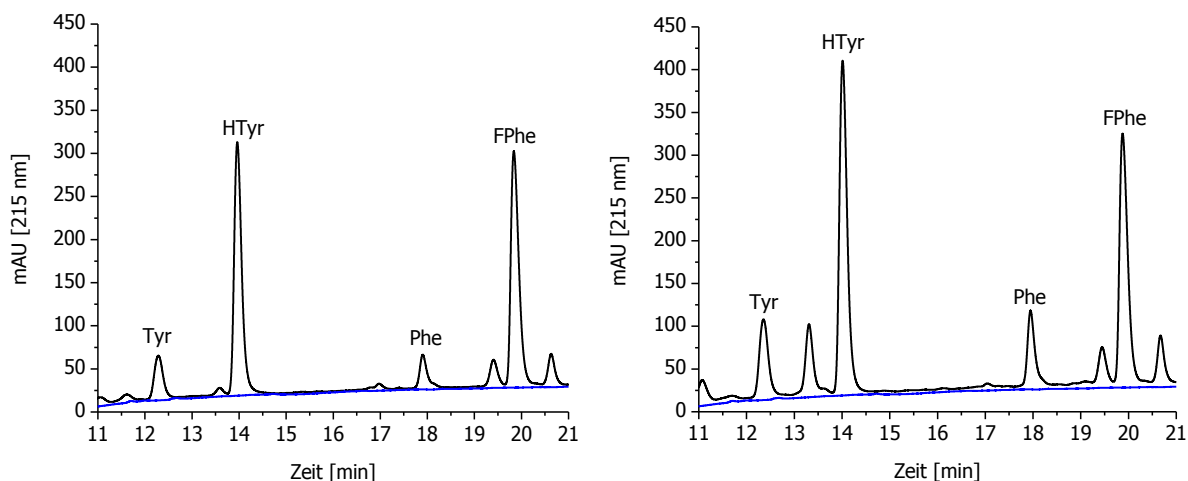


Abbildung 8.34: Chromatogramm einer Probe von hydrolysiertem Rinder-IgG (links) und von hydrolysiertem Magermilch sowie jeweils einer Blindprobe (blau).

### 8.3.7 Mikrowellenhydrolyse

Um die Analysezeit zu verkürzen, wurde die Hydrolyse unter Verwendung eines Mikrowellensystems von CEM mit optimiertem HPLC-Gläschen-Einsatz (Kap. 8.2.5) durchgeführt. Die Hydrolysezeit konnte so von 22 Stunden (Standardbedingungen) auf 30 Minuten reduziert werden. Um eine gleichmäßige Erwärmung zu gewährleisten, wurde die maximale Leistung der Mikrowelle auf 50 W begrenzt. Zusätzlich wurde das Wasser in der Reaktionskammer während der gesamten Hydrolyse mit einem Magnetrührstab gerührt, um eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu erreichen. Die Reproduzierbarkeit wurde überprüft, indem sechs mikrowellenbasierte Hydrolysen der gleichen Probe analysiert wurden. Die relative Standardabweichung lag bei nur 2%, sodass diese Methode für einen höheren Durchsatz an Hydrolyseproben geeignet ist (Anhang Tab. A3).

### 8.3.8 Analyse von heterogenen Proben: Trägermaterial mit immobilisiertem BSA

Die AAAA-Analyse wurde ursprünglich entwickelt, um eine Proteinbestimmung für immobilisierte Proteine zu erhalten. Klassische spektroskopische Proteinbestimmungsmethoden führen bei der Analyse von polymeren oder anorganischen Trägern, wie Glas oder Quarz nur zu semi-quantitativen Ergebnissen, da die Oberfläche oder die Porenstruktur durch starke Wechselwirkungen die Proteinbestimmungen stören.

Als Testprotein wurde BSA verwendet, das auf verschiedenen Trägermaterialien immobilisiert wurde. Die Materialien wurden dem Hydrolyseverfahren unterzogen (5 mg Trägermaterial plus 20 µL interner Standard plus 200 µL 6 M HCl) und schließlich chromatographisch analysiert (Abb. 8.35). Nach der Hydrolyse des Trägermaterials konnte über die Bestimmung von Tyrosin und Phenylalanin die Immobilisierungsdichte  $I_{BSA}$  des Trägermaterials mit folgender Formel bestimmt werden.

$$I_{BSA} \left[ \frac{mg}{g} \right] = \frac{\varepsilon \cdot Fl che(AS)}{Fl che(int.Std.) \cdot Anzahl_{AS}} \cdot 0,025 \frac{mmol}{L} \cdot 66 \frac{g}{mmol} \cdot \frac{0,2 mL}{Einwaage[g]}$$

mit:

$$\varepsilon = \frac{Fl che(HAS_{Standard})}{Fl che(AS_{Standard})}$$

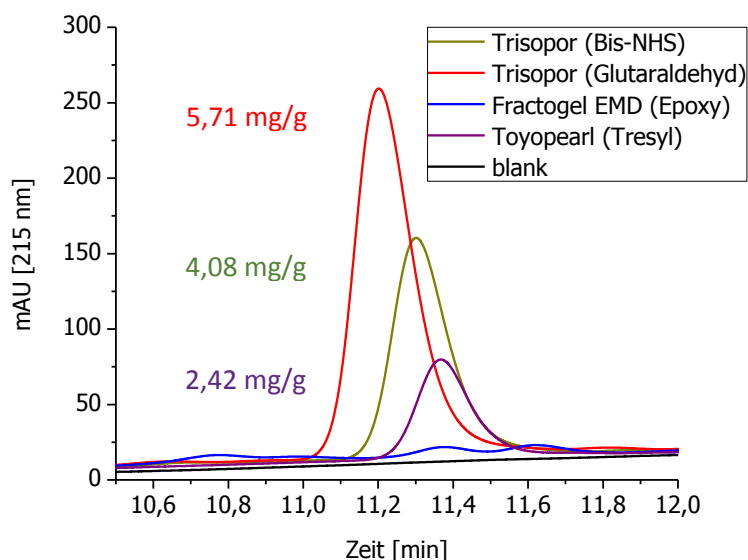


Abbildung 8.35: Tyrosin-Peaks der Chromatogramme nach Hydrolyse von mit BSA-gekoppelten Trägermaterialien und die daraus berechneten Immobilisierungsdichten in mg pro g Trägermaterial (Amino-Trisopor™, aktiviert mit Bis-NHS-Diglycolsäure; poröses Glas, aktiviert mit Glutaraldehyd; Tresyl-aktiviertes Toyopearl® und Epoxy-aktivierten Fractogel® EMD).

Die höchste Immobilisierungsdichte wurde auf dem porösen Glas mittels Glutaraldehyd-Verfahren mit 5,71 mg pro g Trisopor™ 1500 erzielt. Mittels Bis-NHS-Ester-Verfahren wurde eine Belegung von 4,08 mg/g erreicht und auf Tresyl-Toyopearl® 2,42 mg/g. Das Epoxy-aktivierte Material führte zu ungewöhnlich niedrigen Werten, was durch eine unzureichende Blockierung erklärbar wäre. Darüber hinaus sind Materialien auf Basis von Kohlenhydraten (z. B. Sephadex oder Agarose) ungeeignet, da sich die Trägermaterialien bei der sauren Hydrolyse zersetzen und zu dunkel gefärbten Lösungen führen.

Insgesamt ist die Verwendung der aromatischen Aminosäureanalyse (AAAA), basierend auf der Bestimmung von Tyrosin und Phenylalanin in einem Standard-HPLC-System mit UV-Detektor, eine gute Alternative zu den bekannten Proteinbestimmungsverfahren, die entweder komplizierter, teurer, zeitaufwendiger oder ungenauer sind (vor allem bei Proteinbestimmungen auf Trägermaterialien). Die chromatographische Bestimmung aromatischer Aminosäuren in Verbindung mit schneller Hydrolyse in der Mikrowelle scheint ein vernünftiger Kompromiss zwischen Zeit- und Arbeitsaufwand auf der einen Seite und analytischer Zuverlässigkeit und Genauigkeit auf der anderen Seite zu sein. Die Nachweisgrenzen in Bezug auf Proteine sind vergleichbar mit denen der spektroskopischen Assays, bieten jedoch eine höhere Genauigkeit, sofern Informationen über die Aminosäurezusammensetzung zur Verfügung stehen. Auch ohne solche Informationen sollte die Genauigkeit der Proteinbestimmung besser sein als bei spektroskopischen Methoden, die in der Regel mit einem falschen Protein kalibriert werden. Die Reproduzierbarkeit der AAAA ist sehr gut. Eine routinemäßige Anwendung von AAAA würde die Qualität vieler Proteinbestimmungen deutlich verbessern, die mit einfachen und billigen, aber weniger präzisen Methoden durchgeführt werden. Eine Qualitätskontrolle (QC) biochemischer Produkte auf der Basis von Peptiden und Proteinen, unabhängig davon, ob es sich um reine Verbindungen, wie pharmazeutische Medikamente oder komplexe Proteingemischen oder Extrakte, wie Milchpulver handelt, könnte mittels AAAA durchgeführt werden. Die instrumentellen Anforderungen sind sehr moderat und somit kann dieser Ansatz erfolgreich auch in weniger spezialisierten Labors angewandt werden, in denen Aminosäureanalysen bisher nicht einmal in Erwägung gezogen wurden.

Das AAAA-Verfahren ist eine vielversprechende Technik, Immobilisierungsdichten auf Affinitätsmaterialien auf der Basis von Methacrylat, Glas oder Keramik zu bestimmen. Hiermit könnte der Mangel an quantitativen und zuverlässigen Methoden, kovalent gebundene Proteine auf festen Trägern und Oberflächen zu bestimmen, überwunden werden. Eine Validierung dieses Verfahren konnte nicht durchgeführt werden, da kein Standard für Trägermaterialien mit immobilisierten Proteinen kommerziell erhältlich ist. Als konkrete Anwendung wird diese Methode zur Bestimmung der Ligandendichten der in dieser Arbeit hergestellten TNT-Affinitätssäulen genutzt (Kap. 10.4).



## 9 Reinigung von TNT-Seren

Für eine selektive TNT-Affinitätssäule mit hoher Kapazität, müssen die anti-TNT-Antikörper von einer Vielzahl von Proteinen aus dem Antiserum isoliert werden. Zunächst wird die gesamte IgG-Menge des Serums mit der etablierten Protein-A-Affinitätschromatographie abgetrennt (Kap. 4.2.1). Da sich das ELISA-Signal der entsprechenden Fraktion um ca. 50% verringert (Kap. 9.1) und ein Großteil der Antikörper im Serum nicht gegen TNT gerichtet ist, wurde eine Antigen-spezifische Reinigung durchgeführt, deren Entwicklung erläutert wird.

### 9.1 Reinigung mit Protein A

Um eine TNT-Affinitätssäule auf Basis von anti-TNT-Antikörpern zu entwickeln, müssen die Seren zunächst gereinigt werden. Zu Beginn wurden die Antikörper der entsprechenden Seren mittels Protein-A-Affinitätschromatographie separiert. Diese Methode wurde bereits 1972 entwickelt und ist auf dem Markt sehr gut etabliert (Kap. 2.2). Durch die Protein-A-Aufreinigung erhält man eine deutliche Reduktion des Proteinanteils im Vergleich zum Ursprungsserum. Die Protein-A-Reinigung wurde mit beiden Seren durchgeführt und die erhaltenen IgG-Fractionen mittels TNT-ELISA getestet. Die maximale Intensität des Signals des kompetitiven TNT-ELISA reduziert sich bei K1B9 um 48%, bei K2B12 auf 50%.

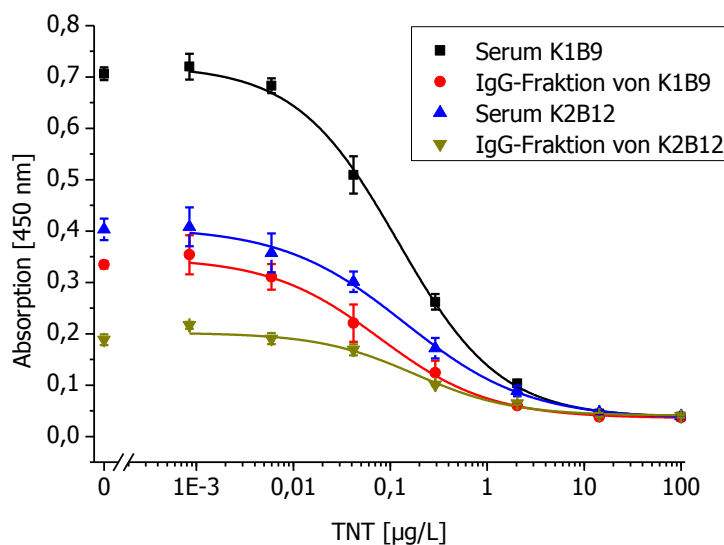


Abbildung 9.1: TNT-ELISA mit den TNT-Hyperseren bzw. den korrespondierenden IgG-Fractionen (Verdünnungen K1B9 1:400000, K2B12 1:200000).

Zur Quantifizierung wurden die Proteinmengen der IgG-Fractionen mittels UV-Absorption bei 280 nm bestimmt: IgG<sub>K1B9</sub>:  $4,38 \pm 0,35$  mg/mL, IgG<sub>K2B12</sub>:  $6,68 \pm 0,37$  mg/mL. Das Serum K1B9 enthält demnach weniger Antikörper, jedoch erzeugt es ein höheres Signal beim TNT-ELISA, das durch den spezifischen TNT-Tracer erzeugt wird. Die höhere Antikörpermenge des K2B12-Serums könnte durch eine Erkrankung des Versuchstiers während der Immunisierung erklärt werden. So würde das Immunsystem des erkrankten Tiers in dieser Zeit sowohl anti-TNT-Antikörper als auch Antikörper gegen den aktuellen Krankheitserreger produzieren.

## 9.2 Antigen-spezifische Reinigung

Bei der einfachen Aufreinigung mittels Protein-A-Affinitätschromatographie liegen einige Nachteile auf der Hand. Zum einen wird lediglich die IgG-Fraktion separiert, von der in der Regel nur ein Bruchteil spezifische anti-TNT-Antikörper sind. Zum anderen wird die Intensität der TNT-ELISA-Signale bei der Protein-A-Reinigung der Seren um die Hälfte gegenüber den Ausgangsseren verringert (Abb. 9.1). Daher wurde eine TNT-spezifische IgG-Aufreinigungsmethode entwickelt.

### 9.2.1 Affinitätssäule mit 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (TN6PHA) als Ligand

Eine Möglichkeit die TNT-Kapazität der im Rahmen dieser Arbeit herzustellenden TNT-Affinitätssäule zu steigern, ist die Aufreinigung des Serums mit Hilfe eines geeigneten Haptens, sodass statt der Gesamt-IgG-Fraktion nur die spezifischen anti-TNT-Antikörper separiert werden. Da zur Immunisierung der Kaninchen das Hapten TN6PHA – gekoppelt an BSA – verwendet wurde, wurde mit dem Hapten eine Affinitätssäule präpariert (Kopplung an Amino-Trisopor™, Abb. 9.2), um die anti-TNT-IgG-Antikörper zu isolieren.

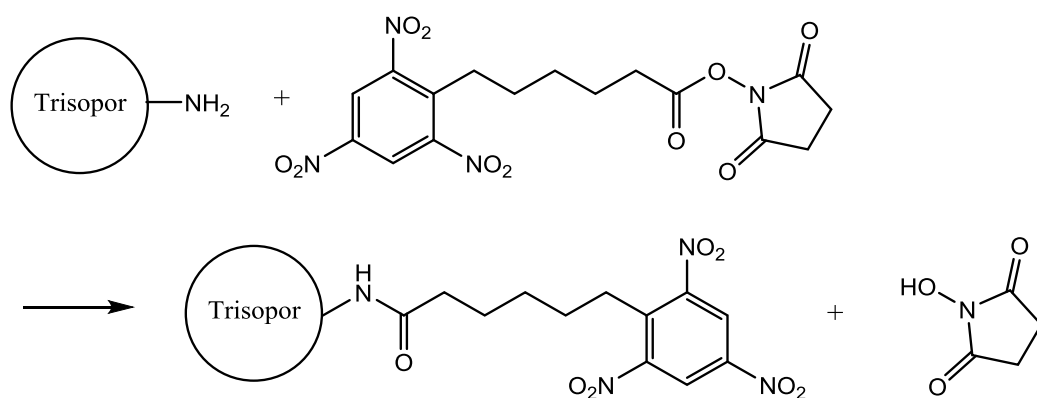


Abbildung 9.2: Reaktionsgleichung der Kopplungsreaktion von 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (TN6PHA) an Trisopor™.

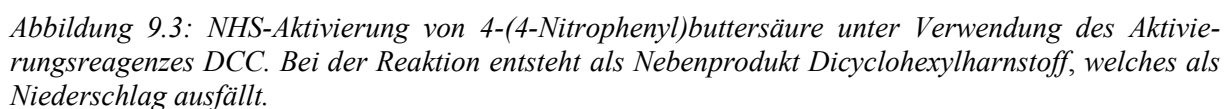
Die Analyse des Eluats (Eluent: 30% ACN, 1% Propionsäure, pH 2,4) mittels ELISA zeigte jedoch, dass die Bindung zur Trinitroverbindung so stark ist, dass keine Elution der Antikörper erfolgte [261].

### 9.2.2 Affinitätssäule mit 4-Nitrophenylgruppen als Liganden

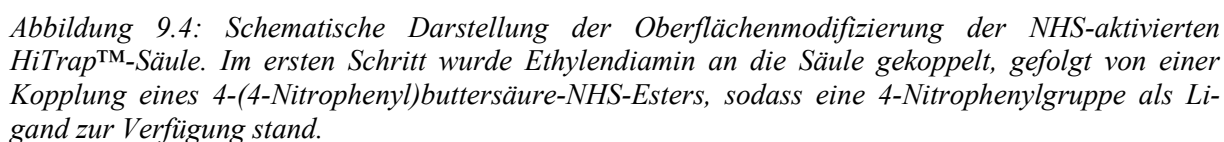
Bei der Affinitätsreinigung sollten die Elutionsbedingungen den Antikörper schonend von der Säule lösen können. Aufgrund der sehr hohen Affinität zum Immunisierungshapten, wurde ein dem TN6PHA strukturähnliches Molekül, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure, welche durch NHS-Chemie aktiviert wurde (Abb. 9.3), als Ligand an eine Sepharose™ Hi-Trap-Säule gebunden.

Bei der Herstellung der Säule wurde darauf geachtet, dass ein Linker mit einer Länge von sechs C-Atomen eingefügt wird, da das zur Immunisierung verwendete Hapten eine Hexylstruktur beinhaltet. Das auf der Affinitätssäule immobilisierte Hapten sollte nicht kürzer sein als das zur Immunisierung verwendete. Ein längerer Spacer reduziert außerdem potenzielle sterische Hinderungen der Antigen-Antikörper-Bindung.





Daher wurde zuerst Ethylendiamin an die NHS-Gruppen des Trägermaterials gekoppelt, um dann an die entstandenen Aminogruppen das mit NHS-Chemie aktivierte Hapten 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure zu binden (Abb. 9.4).



Die mit 4-Nitrophenyl-Liganden besetzte HiTrap™-Affinitätssäule sollte die anti-TNT-Antikörper binden. Die Elutionsversuche wurden unter Verwendung einer Spritzenpumpe getätigt. Das Monitoring der antikörperhaltigen Elutionsfraktionen erfolgte mittels TNT-ELISA. Abbildung 9.5 zeigt einen Abschnitt des Elutionsprofils der Affinitätssäule. Es sind ausschließlich die Fraktionen aufgezeigt, die unmittelbar nach Anschluss des Elutionspuffers Glycin-HCl (pH 2,4) gesammelt wurden. Es wurden 20 µL des 1:10 verdünnten K2B12-Serums aufgetragen und jeweils 100 µL-

Fractionen aufgefangen (100 µL sechsfach konzentrierter PBS wurde zur Neutralisation vorgelegt). Ein Aliquot wurde für den anschließenden TNT-ELISA eingesetzt.

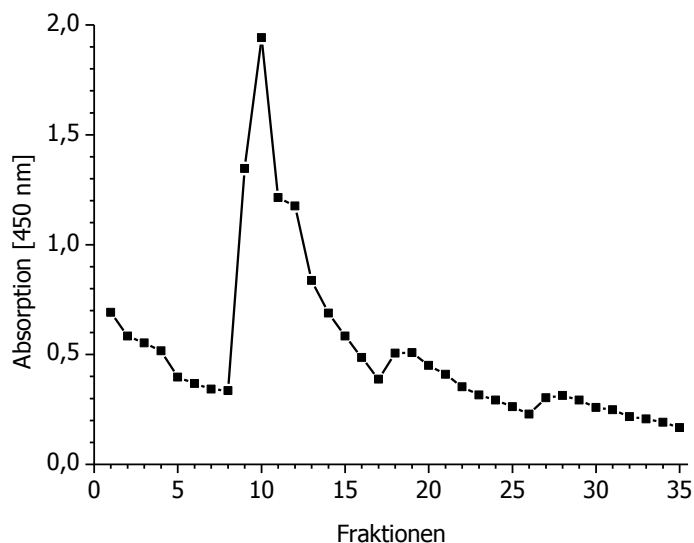


Abbildung 9.5: Elutionsprofil der Affinitätssäule mit 4-Nitrophenylgruppe als Ligand. Der Nachweis der eluierten anti-TNT-Antikörper des aufgetragenen K2B12-Serums erfolgte mittels TNT-ELISA. Als Elutionsmittel wurde 0,1 M Glycin-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,4 verwendet. Flussrate: 0,4 mL/min, Fraktionsvolumen jeweils 100 µL.

Im Profil ist eine Stufenbildung von jeweils neun Fraktionen zu erkennen. Diese resultiert aus der manuellen Fraktionierung mittels Spritzenpumpe (Neubeladung der Spritze nach neun Fraktionen). Die ersten acht Fraktionen repräsentieren das Totvolumen der Säule (800 µL). Der Inhalt dieser Fraktionen enthält demnach noch den zuvor verwendeten Waschpuffer (PBS, pH 7,6). Es ist ersichtlich, dass bereits nachweisbare Mengen an Antikörpern mit dem Waschpuffer ausgetragen wurden (Signale von bis zu 0,5 mAU wurden verzeichnet; 0,2 mAU wurden bei Antikörperabwesenheit beobachtet). Somit binden die anti-TNT-Antikörper an der stationären Phase für eine Aufreinigung nicht fest genug. Beginnend mit Fraktionen neun, ist die Ausbildung eines Peaks im Profil zu erkennen. Durch Anwesenheit des sauren Elutionspuffers (Glycin-HCl, pH 2,4) lösen sich die Antikörper vermehrt von der Säule, was zeigt, dass ein Anteil der anti-TNT-Antikörper an der Säule gebunden wurde. Ob diese Bindung auf einer spezifischen Wechselwirkung des Antikörpers mit dem Liganden beruht, wurde deshalb im nächsten Schritt untersucht.

Hierfür wurde ein Serum auf die Säule aufgetragen, welches einen Antikörper beinhaltet, der gegen PETN gerichtet ist. PETN ist ein, im Vergleich zu TNT, strukturell sehr unterschiedlicher Explosivstoff. Der Ligand sollte daher nicht mit den Antikörpern interagieren, sodass die Antikörper mit dem Waschvolumen ausgetragen werden sollten.

Das Diagramm (Abb. 9.6) wurde mittels eines PETN-ELISAs erstellt. Die anti-PETN-Antikörper sind nicht wie angenommen im unmittelbaren Durchlauf enthalten, sondern werden verzögert von der Säule gewaschen. Es wäre ein Durchlaufpeak beginnend mit Fraktion neun zu erwarten gewesen. Es wurden jedoch erst ab ca. 1500 µL (Fraktion 15) anti-PETN-Antikörper zunehmend in den Waschfraktionen nachgewiesen. D. h. die Säule bindet anti-TNT-Antikörper nicht nur spezifisch, sondern sie bindet auch unspezifisch andere Antikörper in größeren Mengen.

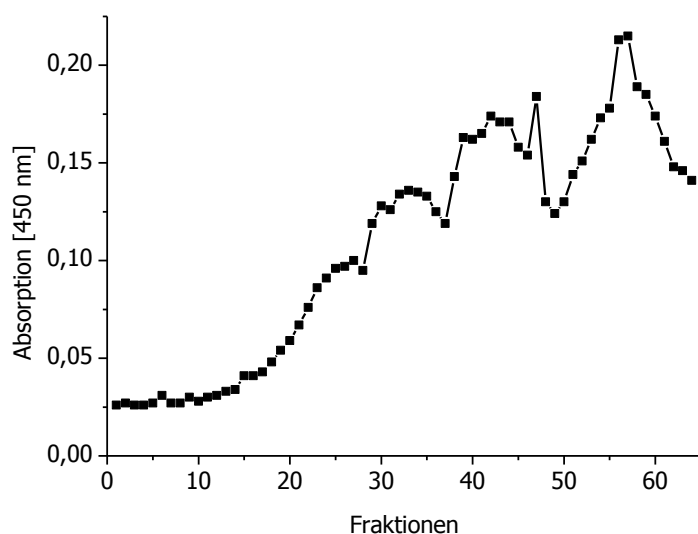


Abbildung 9.6: Überprüfung der TNT-Selektivität der 4-Nitrophenyl-Affinitätsäule durch Verwendung des PETN-Hyperimmunserums 3 (Negativserum). Der fraktionierte Durchfluss wurde mittels PETN-ELISA ausgewertet. Auftrag des Serums mit der Flussrate  $2 \mu\text{L}/\text{min}$ , anschließende Flussrate:  $0,4 \text{ mL}/\text{min}$ . Fraktion 1-36: Waschpuffer (PBS, pH 7,6). Fraktion 37-64: Elutionspuffer ( $0,1 \text{ M}$  Glycin-HCl,  $0,5 \text{ M}$  NaCl, pH 2,4), Fraktionsvolumen jeweils  $100 \mu\text{L}$ .

Anschließend wurden Probeläufe durchgeführt, bei denen zum Waschpuffer  $0,1\%$  Tween<sup>®</sup> 20 zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung hinzugefügt wurde. Die Säule wurde zuvor mit diesem Puffer äquilibriert und auch die Serumprobe wurde vor dem Auftrag 1:10 in diesem Puffer verdünnt. Die anti-PETN-Antikörper bildeten auch unter diesen Bedingungen keinen scharfen Durchlaufpeak. Die Tween<sup>®</sup> 20-Konzentration wurde auf  $1\%$  erhöht. Auch dies brachte keinen Erfolg. Die Zugabe von  $5\%$  Acetonitril und  $0,1\%$  Tween<sup>®</sup> 20 zum Waschpuffer war ebenfalls erfolglos. In Testläufen unter Verwendung dieser Säule wurde untersucht, ob saure ( $0,1 \text{ M}$  Glycin-HCl plus  $0,5 \text{ M}$  NaCl, pH 2,4) oder basische ( $0,05 \text{ M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 12,0) Elutionsbedingungen für die Ablösung der anti-TNT-Antikörper zu bevorzugen sind. Es konnte beobachtet werden, dass unter basischen Bedingungen  $41\%$ , während bei sauren Bedingungen lediglich  $14\%$  der anti-TNT-Antikörper von der Säule gelöst wurden (Abb. 9.7). Ein Großteil der anti-TNT-IgGs ging bereits bei den Waschprozessen verloren.

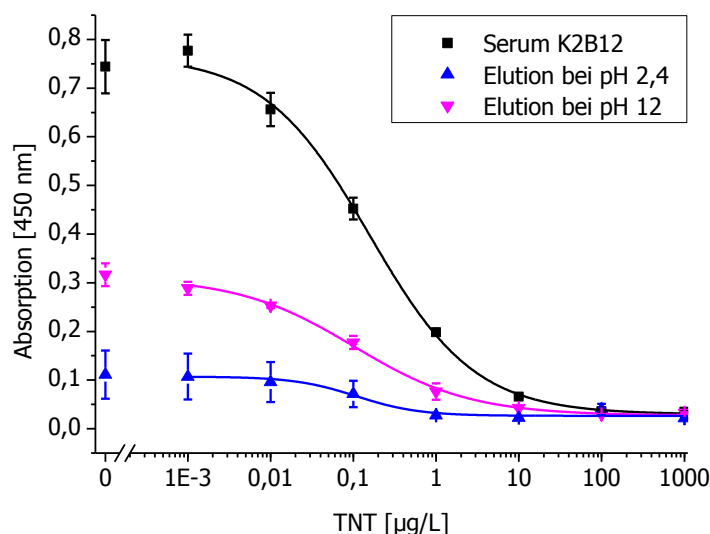


Abbildung 9.7: TNT-ELISA der Elutionsproben der 4-Nitrophenyl-Affinitätssäule bei pH 2,4 und pH 12 sowie unbehandeltes Serum zum Vergleich.

Die Experimente mit dieser Säule zeigten zum einen, dass die Affinität zum Liganden nicht ausreichend ist, um die Antikörper auf der Säule zu halten, da ein deutlich nachweisbarer Anteil der Antikörper in der Waschfraktion nachzuweisen war. Zum anderen wurden auch anti-PETN-Antikörper auf der Säule zurückgehalten. PETN besitzt keine Phenylgruppe, daher ist eine Bindung dieses Antikörpers an der 4-Nitrophenylgruppe nach dem Affinitätsprinzip auszuschließen. Die beobachtete Retention basiert wahrscheinlich darauf, dass die Matrix zu stark mit Phenylgruppen beladen ist, da der Ligand bei der Kopplung im Überschuss eingesetzt wurde. Dies verleiht der Säule Charakteristika einer Reversed-Phase-Chromatographie-Säule. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Matrix werden somit Proteine unspezifisch auf der Säule zurückgehalten.

### 9.2.3 pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper in Abhängigkeit von der Zeit

Um die Schädigung der anti-TNT-Antikörper des K2B12-Serums bei sauren beziehungsweise basischen Elutionsbedingungen zu quantifizieren, wurden die Serumsproben für 5, 15, 30 bzw. 60 min im jeweiligen Elutionspuffer inkubiert und anschließend im kompetitiven TNT-ELISA getestet. Die Schädigungen der Antikörper führten zu einer Abnahme der Extinktionsniveaus der TNT-Kalibrierkurven. Als Referenz wurde jeweils eine Probe unter neutralen Bedingungen (PBS, pH 7,6) mitgeführt, sodass die Stabilität der Antikörper berechnet werden konnte (Abb. 9.8).

Die anti-TNT-Antikörper wurden bei pH-Werten von 3,0, 10,0 und 11,0 gar nicht beziehungsweise nur in geringem Maße geschädigt. Extremere pH-Bedingungen (pH 2,0; 2,4; 12,0) schädigten die Antikörper bereits merklich nach 5-minütiger Inkubationszeit, sodass sich die Intensität des ELISA-Signals um ca. 20% reduzierte. Bei längerer Kontaktzeit (bis 60 min) im sauren beziehungsweise basischen Milieu wurde keine weiteren Schädigungen der Antikörper beobachtet, welche zur Schwächung der Signale geführt hätte.

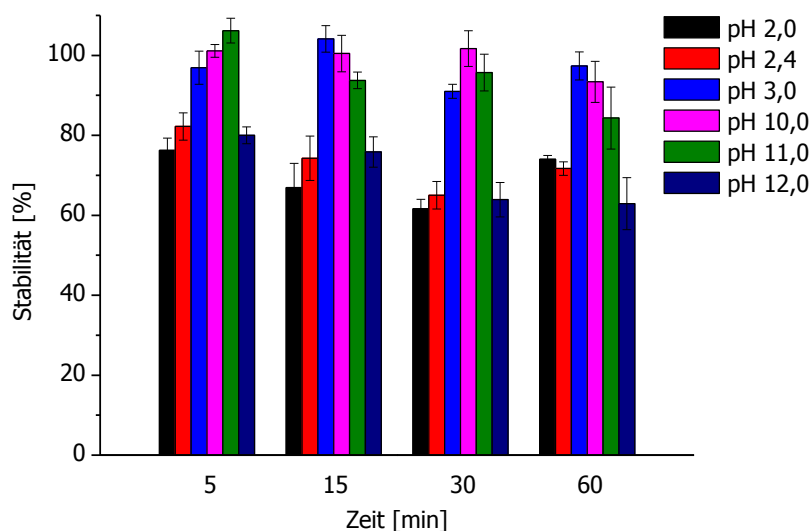


Abbildung 9.8: pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper des Serums K2B12 in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden Konditionen mit 0,1 M Glycin-HCl, 0,5 M NaCl, und 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, sowie als Referenz jeweils PBS pH 7,6 getestet (nicht dargestellt, dieser Referenzwert wurde jeweils auf 100% gesetzt). Schwarz: Glycin-HCl, pH 2,0. Rot: Glycin-HCl pH 2,4. Hellblau: Glycin-HCl pH 3,0. Rosa: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 10,0, Grün: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 11,0, Dunkelblau: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 12,0. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an (n = 9).

Die Elutionsversuche zeigten, dass saure Konditionen allein für die Elution der anti-TNT-Antikörper von der Affinitätssäule unzureichend sind, sodass bei nicht basischer Elution ein 30% ACN-Anteil dem Elutionsmittel zugegeben wird. Deshalb wurden die Stabilität der anti-TNT-Antikörper aus dem Serum K2B12 auch bei Konditionen mit einem Zusatz von 30% Acetonitril getestet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min in einer Lösung mit 30% ACN konnte keine Schädigung der Antikörper festgestellt werden (Nachweis mittels TNT-ELISA).

#### 9.2.4 Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper

Eine Affinitätsreinigung kann nur durch ein Molekül erfolgen, welches dem TNT strukturell ähnelt. Die Affinität der Antikörper zu diesem Liganden sollte dabei ausreichend stark sein, um selektiv an das Epitop zu binden und schwach genug um unter geeigneten Elutionsbedingungen von der Säule gelöst zu werden. Um ein geeignetes Molekül mit adäquater Kreuzreaktion zu finden, wurden Kreuzreaktionen der Seren zu Verbindungen ermittelt, die dem Hapten strukturähnlich sind.

Mit den Hyperimmunseren K1B9 und B2B12, welche Antikörper gegen TNT enthalten, wurden Kreuzreaktivitätsversuche durchgeführt. Das Serum K1B9 wurde bzgl. 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure jeweils im Vergleich zu TNT im direkten kompetitiven ELISA-Format getestet (Abb. 9.9).

Die Kreuzreaktivität von K1B9 ist zu allen getesteten Substanzen sehr schwach. Das Serum K2B12 zeigt etwas ausgeprägtere Kreuzreaktivitäten (Abb. 9.10). Es wurde bzgl. der Substanzen 2-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure untersucht.

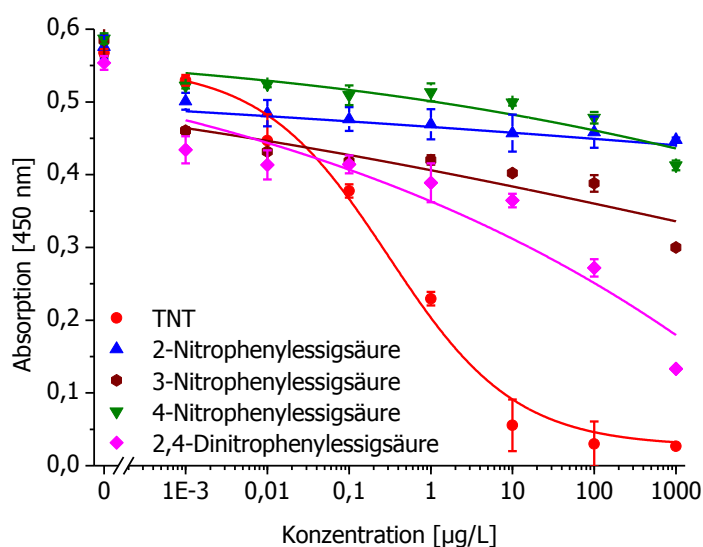


Abbildung 9.9: Kreuzreaktivitäten der anti-TNT-Antikörper des K1B9-Serums zu 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure, rot: ELISA-Kalibrierkurve mit TNT. Die Fehlerbalken stellen die einfache Standardabweichung ( $n=3$ ) dar. Das K1B9-Serum wurde im ELISA 1:200000 verdünnt aufgetragen.

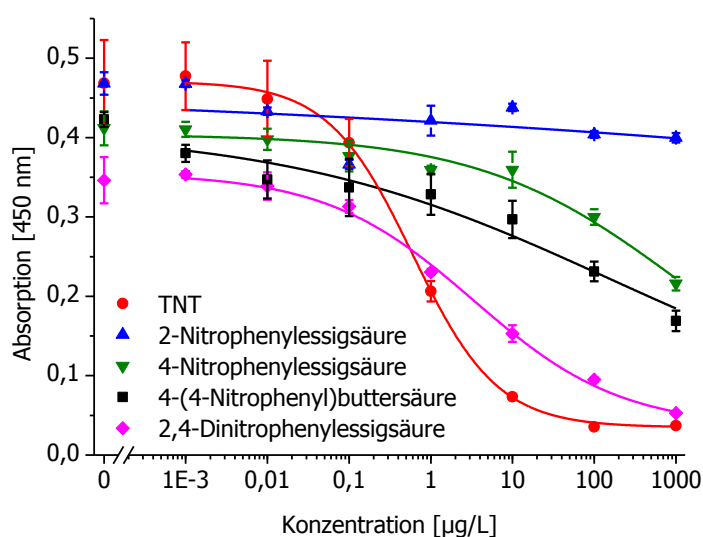


Abbildung 9.10: Kreuzreaktivität der anti-TNT-Antikörper des K2B12-Serums zu den Substanzen 2-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure. Rot: ELISA-Kalibrierkurve mit TNT. Die Fehlerbalken stellen die einfache Standardabweichung ( $n=3$ ) dar. Das K2B12-Serum wurde im ELISA 1:100000 verdünnt aufgetragen.

Die rote Kurve zeigt die Kalibrierkurve von TNT. Die Kreuzreaktivität kann quantifiziert werden, indem die Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ) der Kurven gemäß Formel

$$KR[\%] = \frac{C_{TNT}}{C_{test}} \cdot 100$$

ins Verhältnis gesetzt werden. Die Testmittelpunkte aller untersuchten Substanzen wurden unter der Annahme berechnet, dass die Kurven bei Erhöhung der Analytkonzentration die Werte der unteren Asymptote der TNT-Kurve annehmen. Einen Überblick der Kreuzreaktivitäten der anti-TNT-IgG von K2B12 bietet Tabelle 9.1.

Tabelle 9.1: Kreuzreaktivitäten [%] der anti-TNT-Antikörper der Seren zu 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure.

Substanz	KR [%] von K1B9	KR [%] von K2B12
TNT	100	100
2-Nitrophenylelessigsäure	0	0
3-Nitrophenylelessigsäure	< 0,1	n.b.
4-Nitrophenylelessigsäure	< 0,01	< 0,1
4-(4-Nitrophenyl)buttersäure	n.b.	0,4
2,4-Dinitrophenylelessigsäure	0,3	18,1

n.b.: nicht bestimmt

Der Tabelle 9.1 ist zu entnehmen, dass für die getesteten Mononitrophenyl-Verbindungen nur eine sehr schwache bis gar keine Kreuzreaktivität zu den anti-TNT-Antikörpern nachgewiesen werden konnte. 2,4-Dinitrophenylelessigsäure zeigte beim K1B9-Serum eine schwache Kreuzreaktivität, die Antikörper des K2B12-Serums weisen hingegen eine deutliche Kreuzreaktivität von 18% zu 2,4-Dinitrophenylelessigsäure auf. Es ist ersichtlich, dass die polyklonalen Hyperseren K1B9 und K2B12 ein unterschiedliches Bindungsverhalten zu den jeweiligen Substanzen aufweisen. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozytenlinien gebildet, sodass letztendlich ein

heterogenes Gemisch an Antikörper gebildet wird, die gegen verschiedene Epitope eines Antigens gerichtet sind [262]. Das Immunsystem jedes Individuums reagiert unterschiedlich, weshalb sich auch bei der Hyperimmunisierung der beiden Kaninchen verschiedene Antikörpergemische mit differierenden Charakteristika entwickelt haben.

Die unterschiedliche Antikörperzusammensetzung wurde besonders bei der Kreuzreaktivitätsbestimmung bezüglich 2,4-Dinitrophenyllessigsäure deutlich. Das K1B9-Serum zeigte eine schwache Kreuzreaktivität von 0,3%, wohingegen das K2B12-Serum eine Kreuzreaktivität von 18,1% aufwies. *Ramin und Weller* hatten zuvor bereits die Kreuzreaktivität der Seren zu einer sehr ähnlichen Substanz, dem 2,4-Dinitrotoluol, bestimmt [5]. Es ergaben sich Kreuzreaktivitäten von  $0,6 \pm 0,2\%$  für das K1B9-Serum und  $38 \pm 9\%$  für das K2B12-Serum. Diese Ergebnisse unterstreichen die unterschiedlichen Charakteristika der Seren und bestätigen die bessere Affinität des K2B12-Serums zum 2,4-Dinitroaromaten. Die Carboxylgruppe der 2,4-Dinitrophenyllessigsäure könnte für die schwächere Kreuzreaktivität im Vergleich zu 2,4-Dinitrotoluol verantwortlich sein. Die Kreuzreaktivität des K2B12-Serums zur 2,4-Dinitrophenylgruppe wurde als adäquat für den Einsatz in der Affinitätschromatographie eingestuft. Daher wurde in darauffolgenden Experimenten ausschließlich das K2B12-Serum genutzt.

#### **9.2.5 HiTrap™-Affinitätssäule mit 2,4-Dinitrophenylgruppen als Liganden**

Da sowohl die Ergebnisse der HiTrap™-Säule mit 4-Nitrophenylgruppen als Liganden als auch die Kreuzreaktivitätsbestimmung darauf hindeuten, dass die 4-Nitrophenylgruppe nur eine unzureichende Affinität zu den anti-TNT-Antikörpern besitzt, wurde eine HiTrap™-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden hergestellt (Abb. 9.11). Nur 5% der aktiven Gruppen auf der Matrixoberfläche der Säule wurden mit Dinitrophenyl-Liganden besetzt. Dies sollte unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen reduzieren und eine doppelte Bindung des Antikörpers unterbinden.

Bei der Herstellung des Affinitätsmaterials, konkreter bei der Beschickung mit dem Liganden, wurde eine tiefrote Verfärbung beobachtet. Auch bei der Verwendung eines basischen Elutionspuffers wurde eine leichte Rotfärbung verzeichnet. Vermutlich kam es zur Ausbildung von Salzen ähnlich dem des Meisenheimer-Komplexes. Diese Farbreaktion tritt bei einer Vielzahl von Polynitroaromaten unter alkalischen Bedingungen auf. Eine Ladungsdelokalisation führt zur Verschiebung der Absorptionsmaxima in den langwelligeren, sichtbaren Wellenlängenbereich (Abb. 1.1) [263].

Zunächst wurde die unspezifische Bindung dieser Säule unter Verwendung der anti-PETN-Antikörper untersucht. Dazu wurden 20 µL des 1:10 verdünnten PETN-Serums mit der Spritzenpumpe auf die Säule aufgetragen. Hierfür wurden die ersten 3200 µL des Waschvolumens hinsichtlich des anti-PETN-Antikörpergehaltes mittels PETN-ELISA getestet. Dieses Volumen sollte ausreichend sein, um die Antikörper von der Säule zu waschen, wenn keine Interaktion mit dem Säulenmaterial stattfindet. Als Waschpuffer wurde PBS mit 0,1% Tween® 20 eingesetzt. Doch auch an diesem Material wurden die anti-PETN-Antikörper zurückgehalten. In diesem Fall waren schon nach 600 µL erste anti-PETN-Antikörper im Durchlauf mittels PETN-ELISA nachweisbar. In der letzten untersuchten Waschfraktion (3100-3200 µL) war die maximale Antikörperkonzentration enthalten.

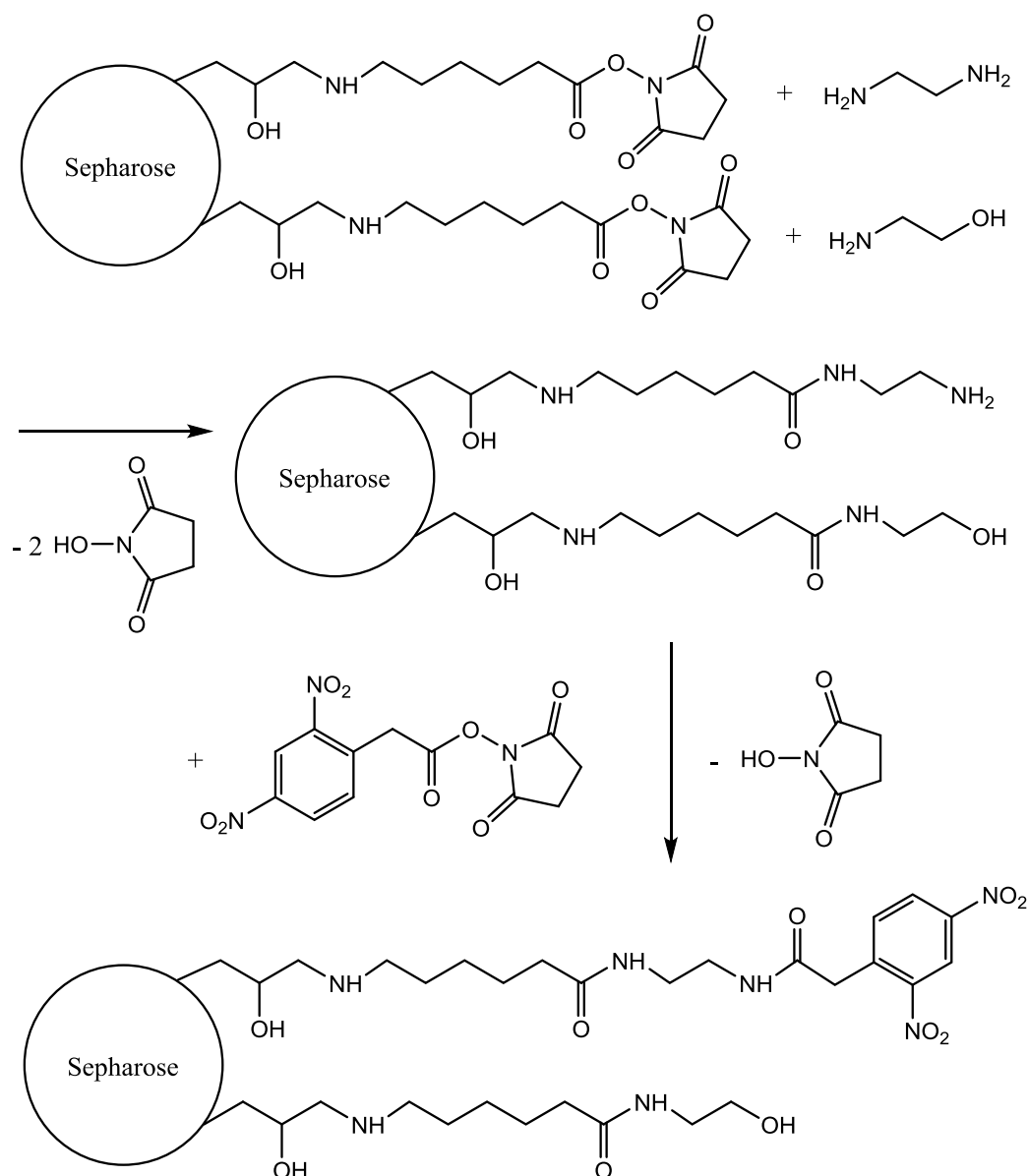


Abbildung 9.11: Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung der NHS-aktivierten HiTrap™-Säule. Im ersten Schritt wurden Ethylendiamin und Ethanolamin im Verhältnis 1:20 an die Oberfläche gekoppelt. Es folgte die Kopplung eines 2,4-Dinitrophenylessigsäure-NHS-Esters, sodass eine 2,4-Dinitrophenylgruppe als Ligand zur Verfügung steht.

Zudem wurde analysiert, ob die anti-TNT-Antikörper an der 2,4-Dinitrophenyl-HiTrap™-Säule binden. Hierfür wurde die Säule mit PBS, 0,1% Tween® 20 äquilibriert und 1:10 verdünntes K2B12-Serum aufgetragen. Der Durchlauf wurde mittels TNT-ELISA getestet. Die ersten 1300 µL waren frei von anti-TNT-Antikörpern. In den weiteren Fraktionen wurden lediglich Spuren des Antikörpers nachgewiesen, sodass die Säule für eine Aufreinigung ausreichend bindet. Des Weiteren wurden sowohl saure als auch basische Elutionen durchgeführt. Hier zeigte sich das gleiche Verhalten wie bei der HiTrap™-Säule mit 4-Nitrophenyl als Liganden. Die basische Elution führt zu deutlich besseren Resultaten: Mit  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 12 konnten 74% der anti-TNT-Antikörper von der Säule gelöst werden, mit Glycin-HCl, pH 2,4 lediglich 22% (Abb. 9.12).



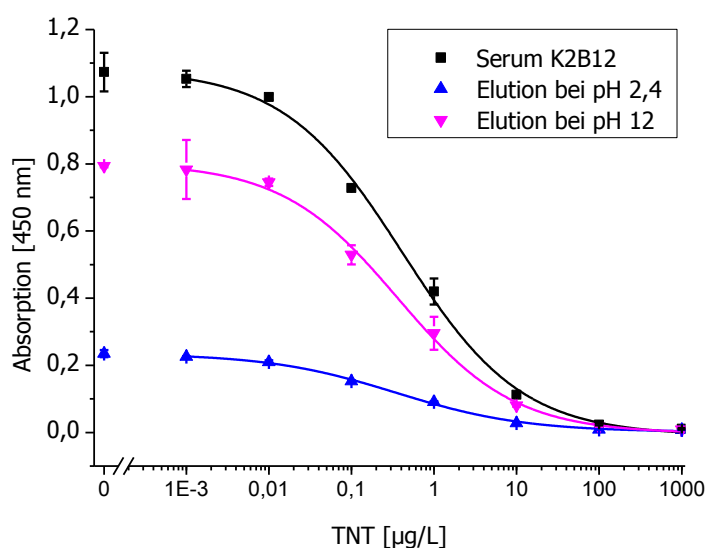


Abbildung 9.12: TNT-ELISA der Elutionsproben der Dinitrophenyl-Affinitätssäule bei pH 2,4 und pH 12 sowie unbehandeltes TNT-Hyperserum zum Vergleich.

Die Ergebnisse zeigten, dass die anti-TNT-Antikörper auf der Dinitrophenyl-Säule gebunden wurden. Einige Antikörper passierten jedoch die Säule, denn es wurden anti-TNT-Antikörperspuren im Durchlauf nachgewiesen. So ist die Kreuzreaktivität einiger IgG-Klone aus der Mischung der polyklonalen Antikörper nicht hoch genug, um an der Dinitrophenylgruppe zu binden. Sterische Gründe sind nahezu auszuschließen, da die HiTrap™-Säule einen zehn C-Atom-langen Spacer-Arm zur Verfügung stellt, der durch die Kopplungsmethode noch um weitere vier C-Atome ergänzt wurde.

Die anti-PETN-Antikörper zeigten auch bei dieser Säule ein Bindungsverhalten. Somit schien der hydrophobe Interaktionsmechanismus, resultierend aus der hohen Phenylbeladung, nicht allein für das Bindungsverhalten anderer Proteine verantwortlich zu sein. Das Binden nicht-spezifischer Proteine bei der Affinitätschromatographie ist allgemein bekannt. Deshalb werden dem Waschpuffer in der Regel Substanzen zugefügt, die zur Unterbindung nicht-spezifischer Interaktionen beitragen. Gängige Strategien sind beispielsweise das Hinzufügen von Salz (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>) oder die Erhöhung des pH-Wertes des Waschpuffers. Dies kann einen erheblichen Einfluss auf den Protonierungs-/Ionisierungsstatus des Moleküls haben, sodass involvierte Wasserstoffbindungen und ionische Interaktionen beeinflusst werden. Hydrophoben Interaktionen kann entgegengewirkt werden, indem die Salzkonzentration erniedrigt wird oder oberflächenaktive Additive wie Tween® 20 oder Triton X-100 zugesetzt werden. Auch organische Lösungsmittel wie Methanol oder Ethylenglycol können verwendet werden. Unspezifische Bindungen können auch durch Absättigen der Matrixoberfläche (z. B. mit BSA) verhindert werden [262].

Einige Strategien wurden verfolgt: Der Zusatz von Methanol und Ethylenglycol zeigte keinen Effekt. Der Einsatz von Tween® 20 erwies sich als Additiv im Waschpuffer bei HPLC-Anwendungen ungeeignet, da das Detergenz bei 280 nm leicht absorbiert. Triton X-100 beinhaltet eine Phenylgruppe und absorbiert daher sehr stark bei 280 nm, wodurch auch diese Substanz ungeeignet für die gewünschte Anwendung ist. Anstelle von Tween® 20 muss bei zukünftigen Experimenten auf Detergenzien zurückgegriffen werden, die keine Absorption bei 280 nm aufweisen, z. B. Natriumdeoxycholat. Dies ist ein mildes Detergenz, welches Proteine weder denaturiert, noch inaktiviert [264]. In der Affinitätschromatographie wird das Detergenz bereits eingesetzt. Die Absorption im UV-Bereich

ist gering, variiert jedoch je nach Qualität und Hersteller. Der Hersteller Pierce gibt beispielsweise eine Absorption von  $< 0,04$  bei 280 nm bei Verwendung einer 1%-igen Detergenzlösung an [265].

### 9.2.6 Trisopor™-Affinitätssäule mit 2,4-Dinitrophenylgruppen als Liganden

Die HiTrap™-Säulen (Maximaldruck: 3 bar) wurden mit einer Spritzenpumpe betrieben. Die Handhabung ist umständlich und das Monitoring über den ELISA ist sehr zeitaufwendig. Praxistauglicher ist die Verwendung einer HPLC-Anlage. Hier kann ein erstes Monitoring über die proteintypische Absorption bei 280 nm erfolgen. HiTrap™-Säulen sind aufgrund des zu hohen Maximaldrucks der HPLC-Anlage hierfür nicht kompatibel. Für die automatisierte Verwendung von HiTrap™-Säulen werden vom Hersteller FPLC-Systeme (z. B. Äkta-Systeme) empfohlen [266]. Der Arbeitsbereich solcher Anlagen liegt in einem niedrigeren Druckbereich und der Eigendruck der Anlagen ist gering. Ein solches System stand jedoch nicht zur Verfügung.

Zur Herstellung einer HPLC-tauglichen Affinitätssäule wurde als Trägermaterial Trisopor™-Diol 3000 (mit Diolgruppen als Funktionalisierung) gewählt. Die Diolgruppen reagieren zunächst durch oxidative Spaltung zu Aldehydgruppen (Abb. 9.13).

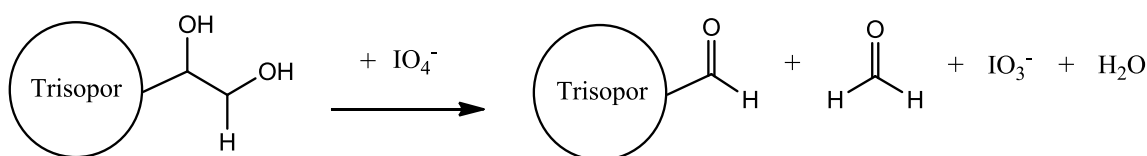


Abbildung 9.13: Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung des Trisopor™-Materials. Die Diolgruppen werden oxidativ durch Natriumperodat zu Aldehyden gespalten [132].

Poröses Glas ist druckstabil und somit bestens für HPLC-Anwendungen geeignet. Da bei den HiTrap™-Säulen das unspezifische Binden von Proteinen als Problem auftrat, wurde bei der Herstellung der Säule ein neuer Ansatz verfolgt, der dieses unterbinden sollte: Polyethylenglycol (PEG-3000) wurde auf das Glasmaterial gekoppelt, sodass die hydrophilen Gruppen den *Fouling*-Effekt unterdrücken sollten. Auch in der Literatur wird der Einsatz von Oligoethylenglycol zur Prävention der unspezifischen Adsorption von Proteinen beschrieben [267-269]. Zusätzlich wurde die Anzahl der funktionellen Gruppen nochmals reduziert, indem die Reagenzien  $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$  und  $\text{H}_2\text{N-PEG-OH}$  im Verhältnis 1:50 eingesetzt wurden, um unspezifische Bindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen an den Phenylgruppen zu verringern. Die 2,4-Dinitrophenylgruppe wurde beibehalten, da vorangehende Experimente diesen Liganden als erfolgsversprechend einstufen ließen. Eine Übersicht der chemischen Modifizierung des Trisopor™-Materials zeigt Abbildung 9.14. Die auch nach zahlreichen Waschschritten starke Gelbfärbung des Glasmaterials, zeigte eine erfolgreiche Kopplung der 2,4-Dinitrophenyl-Liganden an.

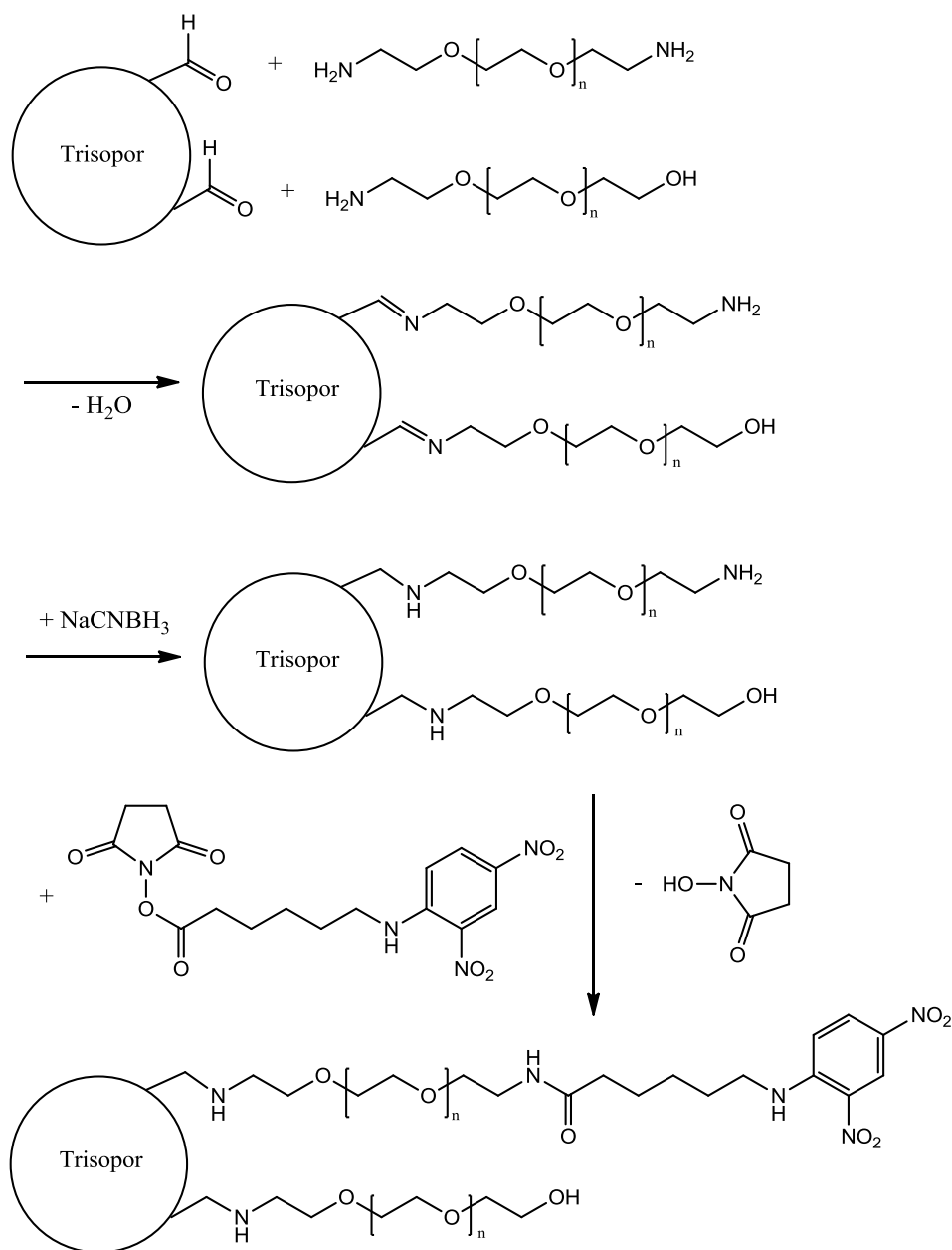


Abbildung 9.14: Die Aldehydgruppen reagieren mit den Aminogruppen der PEG-Moleküle zu einer Schiff'schen Base. Es wurde  $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$  und  $\text{H}_2\text{N-PEG-OH}$  im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid vermittelt die Ausbildung einer stabilen sekundären Aminbindung. An die funktionale Gruppe, die Aminogruppe-(PEG- $\text{NH}_2$ ), wird der N-(2,4-Dinitrophenyl)-6-aminocapronsäure-NHS-Ester gekoppelt, sodass eine 2,4-Dinitrophenylgruppe als Ligand zur Verfügung steht.

### Chromatogramm der Trisopor<sup>TM</sup>-Affinitätssäule

Beim ersten Experiment konnte in dem Chromatogramm von 20  $\mu\text{L}$  K2B12-Serum nur ein deutlicher Durchlaufpeak (Waschpuffer: 0,05 M  $\text{H}_2\text{KPO}_4$ , 0,15 M NaCl, pH 7,6), jedoch kein Elutionspeak (Elutionslösung: 0,05 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,5 M NaCl, pH 3,0) beobachtet werden (hier nicht abgebildet). Auch eine Erniedrigung des Elutionspuffers auf pH 2,4 führte zu keinem Elutionspeak.

Bei den Experimenten mit HiTrap<sup>TM</sup>-Säulen eluierten die anti-TNT-Antikörper bei Verwendung eines basischen Elutionspuffers besser. Da sich die Silanisierungsschicht mit den funktionalisierten Gruppen

im basischen Milieu (bei  $\text{pH} > 9$ ) von den porösen Gläsern ablöst (Kap. 2.2.2), konnte dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden.

Die Rolle des Elutionspuffers ist es, die Interaktion zwischen Rezeptor (hier anti-TNT-Antikörper) und Ligand zu schwächen (Kap. 2.2.1). Die Verwendung von Puffern mit extremen pH-Werten ist geläufig, denn diese unterdrücken ionische Bindungen. Auch eine Erhöhung der Ionenstärke schwächt ionische Bindungen, daher enthalten Elutionspuffer in Vergleich zu den Waschpuffern höhere Salzmengen [270]. Einhergehend mit den obengenannten Kriterien wurde ein Elutionspuffer mit dem pH-Wert 3,0 und eine Veränderung der Salzkonzentration von 0,15 M auf 0,5 M eingesetzt. Experimente, die die pH-Stabilität der anti-TNT-Antikörper in Abhängigkeit von der Zeit untersuchten (Kap. 9.2.3) zeigten, dass bei einem pH-Wert von 3,0 keine Schädigung der anti-TNT-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Der kurzzeitige Kontakt mit saureren Puffern (pH 2,0 und pH 2,4) schädigt die Antikörper hingegen. Bei Erhöhung der Kontaktzeit, verstärkte sich der Effekt nicht. Dies ist damit zu begründen, dass die anti-TNT-Antikörper polyklonalen Ursprungs sind. Das Serum beinhaltet vermutlich eine heterogene Mischung aus säurestabilen und säurelabilen Antikörpern. Auch die Veränderung dieser zwei Parameter ist nicht ausreichend, um die anti-TNT-Antikörper vom 2,4-Dinitrophenyl-Liganden zu lösen.

Daher wurde anschließend folgendes Elutionsmittel eingesetzt [261]: 0,005 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,5 M NaCl, pH 3,0 mit 30% Acetonitril, das zu einem Elutionspeak führt. Im Bereich von 5-10 min ist der Durchlaufpeak zu erkennen (Abb. 9.15). Der Durchlaufpeak im Chromatogramm ist sehr breit, da eine sehr geringe Probenauftragsgeschwindigkeit (0,02 mL/min) gewählt wurde. Eine lange Verweilzeit der Probe in der Säule fördert die Interaktion des Antikörpers mit dem Liganden. Die abgeflachte Peakform resultiert daraus, dass bei 3500 mAU das Maximum des Detektors erreicht wurde. Der Elutionspeak hingegen (bei ca. 16 min) ist sehr schmal und weist eine Höhe von ca. 750 mAU auf. Zur Reinigung der Säule wurde 95% Acetonitril verwendet.

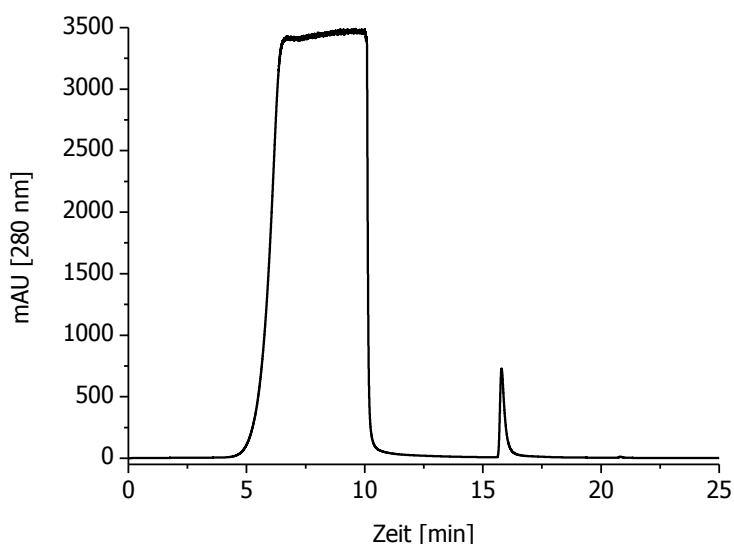


Abbildung 9.15: HPLC-Chromatogramm der Affinitätsaufreinigung von anti-TNT-Antikörpern unter Verwendung einer Trisopor<sup>TM</sup>-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden und PEG-3000 zur Unterbindung unspezifischer Bindungen, Detektion bei 280 nm.

Die Elution musste mit einem Zusatz von 30% Acetonitril erfolgen. Der Einfluss von Acetonitril auf die anti-TNT-Antikörper wurde per TNT-ELISA getestet und es konnte kein schädigender Effekt durch die Anwesenheit von 30% Acetonitril nachgewiesen werden (Kap. 9.2.3).

## Analysen der Durchlauf- und Elutionsfraktion eines Chromatographielaufes

Aus den beschriebenen Ergebnissen ergibt sich, dass als Elutionsmittel 0,005 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,5 M NaCl, pH 3,0 mit 30% Acetonitril verwendet werden muss. Des Weiteren kann das Chromatogramm (Abb. 9.15) lediglich zur Orientierung für die Fraktionierung, nicht aber zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt werden. Daher wurden die Durchlauf- und Elutionsfraktion (5,1 bzw. 5,0 mL) gesammelt. Zur Neutralisation der Elutionsfraktion wurde 5 mL sechsfach PBS (pH 7,0) vorgelegt, sodass sich ein Probenvolumen von 10 mL ergab. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte anschließend mit Proteinquantifizierungskits. Außerdem war die Bestimmung des Gehaltes an anti-TNT-Antikörpern mittels ELISA erforderlich.

Der spezifische Nachweis der anti-TNT-Antikörper erfolgte über den kompetitiven TNT-ELISA. Die Resultate sind in der Abbildung 9.16 veranschaulicht. Die Elutionsprobe wurde entsprechend der Referenz in einer Endverdünnung von 1:150000 im ELISA eingesetzt. Die Verdünnung der Fraktionen bezieht sich auf das aufgetragene Volumen von 20  $\mu\text{L}$  K2B12-Serum. Unbehandeltes 1:150000 verdünntes K2B12-Serum wurde als Referenz mitgeführt ( $100 \pm 6\%$ ).

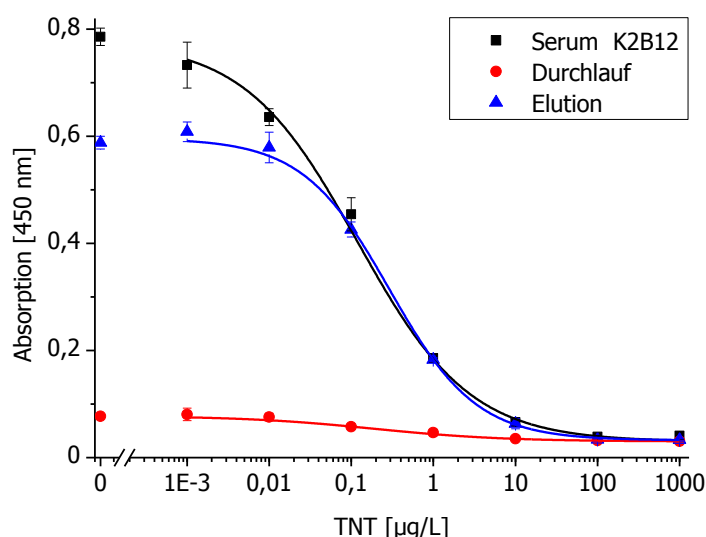


Abbildung 9.16: ELISA-Kurven des Durchlaufs (rot, Verdünnung: 1:1500) sowie der Elution (blau, Verdünnung: 1:150000) der Trisopor™-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden an PEG-3000. Als Referenz wurde ein unbehandeltes 1:150000 verdünntes K2B12-Serum mitgeführt (schwarz). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Triplikate an.

Es konnten  $83 \pm 8\%$  ( $n = 9$ ) der anti-TNT-Antikörper in der Elutionsprobe wiedergefunden werden. Der ELISA-Kurve des Durchlaufs (Abb. 9.16) ist zu entnehmen, dass der spezifische Antikörpergehalt der Durchlaufprobe minimal ist.

## Proteinbestimmungen mittels BCA-Test

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde in einem separaten Verfahren bestimmt. Bei optimaler Funktionsfähigkeit der Säule müsste der Gesamtproteingehalt verglichen zur Elutionsfraktion nur sehr geringe Mengen an Protein beinhalten. Der Proteingehalt des unbehandelten K2B12-Serums des Durchlaufes und der Elutionsfraktion wurde mittels BCA-Test bestimmt. Als Kalibrierstandard wurde BSA eingesetzt. Wird von einem verlustfreien Aufarbeiten ausgegangen, sollte die Summe der Proteinmengen des Durchlaufs- und der Elutionsfraktion dem Proteingehalt des Serums entsprechen. Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Test gewählt.

Tabelle 9.2: Bestimmung der Proteingehalte [ $\mu\text{g}$ ] von 20  $\mu\text{L}$  unbehandelten K2B12-Serum sowie von den Durchlauf- und Elutionsfraktionen (des HPLC-Laufs mit 20  $\mu\text{L}$  K2B12-Auflagerung).

	Proteingehalt [ $\mu\text{g}$ ]	Proteingehalt [%]	Anzahl der Replikate
K2B12	$1131 \pm 50$	$100 \pm 4,4$	9
Durchlauf	$943 \pm 30$	$82 \pm 2,6$	4
Elution	$20 \pm 1$	$2 \pm 0,1$	2

Mit diesem Test konnten konsistente Ergebnisse erzielt werden. Demnach sind  $82 \pm 2,6\%$  des Gesamtproteingehalts in der Durchlauf- und  $2 \pm 0,1\%$  in der Elutionsfraktion enthalten. Letzteres Ergebnis unterliegt einer gewissen Unsicherheit, da der Proteingehalt der eingesetzten Probe, trotz 10-facher Aufkonzentrierung im unteren Bereich der Kalibrierkurve angesiedelt war. Genauere Ergebnisse ließen sich erzielen, indem entweder eine stärkere Aufkonzentrierung erfolgt oder ausschließlich das Elutionsvolumen beim Elutionspeak aufgefangen werden würde. Der geringe Proteingehalt in der Elutionsfraktion spricht dafür, dass durch die Kopplung der PEG-Moleküle auf der Matrixoberfläche das Binden unspezifischer Proteine weitestgehend unterbunden wurde. Die Summe aus Durchlauf- und Elutionsfraktion ergibt nahezu den Wert der aufgetragenen Proteinmenge (85%). Aufgrund der hohen Wiederfindungsrate der anti-TNT-Antikörper und des geringen Gesamtproteingehaltes dieser Fraktion, ist davon aufzugehen, dass die Elutionsfraktion vornehmlich anti-TNT-Antikörper beinhaltet.

### Upscaling der Testsäule zur anti-TNT-Antikörper-Sammlung

Insgesamt ist die Affinitätsaufreinigung der anti-TNT-Antikörper unter Verwendung der Trisopor<sup>TM</sup>-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden an PEG-Molekülen zur Unterdrückung der unspezifischen Bindungen als erfolgreich einzustufen, sodass zur Gewinnung größerer Mengen an spezifischen Antikörper eine größere Affinitätssäule, analog zur Testsäule, hergestellt und verwendet wurde. Hierzu wurden 40 mg Trisopor<sup>TM</sup> funktionalisiert. Mit dieser Säule wurden die spezifischen anti-TNT-Antikörper sowohl von K2B12 als auch von K1B9 separiert. Als Elutionsmittel wurde 70% PBS, 30% ACN, 1% Propionsäure, pH 4,0 gewählt. Das ELISA-Signal der anti-TNT-IgG-Fraktion von K2B12 betrug nach der Reinigung 88% des Ursprungsserums, die des Serums von K1B9 lediglich 78% (Abb. 9.17).

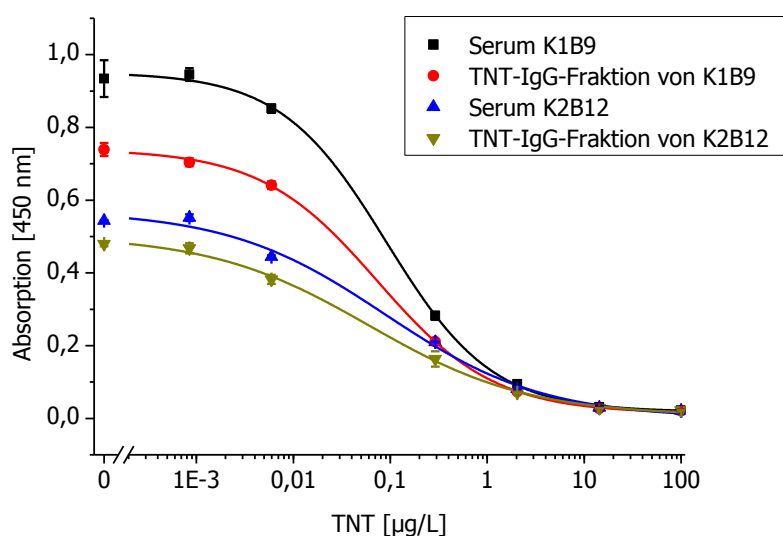


Abbildung 9.17: ELISA-Kurven der Ursprungseren und der anti-TNT-Antikörper nach der antigenspezifischen Reinigung der anti-TNT-Seren (Verdünnungen K1B9 1:200000, K2B12 1:100000).

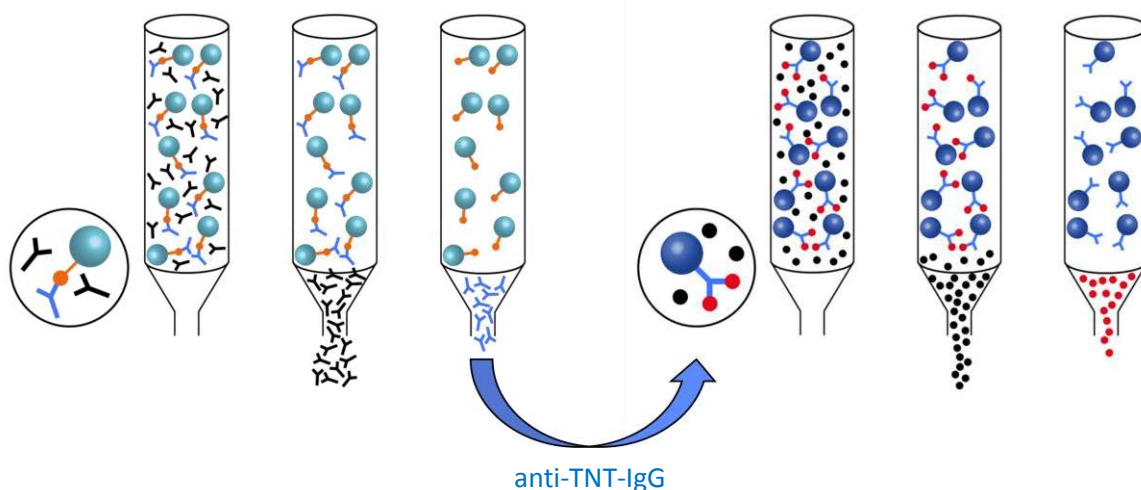
Dass nicht alle polyklonalen Antikörper wiedergefunden wurden, könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle Antikörper am Liganden binden, zum anderen könnten die gebundenen Antikörper unter den Elutionsbedingungen denaturieren oder gar nicht von der Säule gelöst werden. Der prozentual kleinere ELISA-Signalverlust der anti-TNT-IgG-Fraktion des K1B9-Serums lässt sich aufgrund der schwächeren Kreuzreaktivität von K1B9 mit Bindungsverlusten erklären.

Die Proteinkonzentration (Bestimmung mittels 280 nm-Methode) der anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Fraktion betrug  $0,85 \pm 0,08$  mg/mL, die der anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>-Fraktion  $0,81 \pm 0,06$  mg/mL. Für die Gesamt-IgG-Proteinkonzentration (durch Protein-A-Fraktionierung ermittelt) wurde für IgG<sub>K1B9</sub>  $4,38 \pm 0,35$  mg/mL und für IgG<sub>K2B12</sub>  $6,68 \pm 0,37$  mg/mL ermittelt (Kap. 9.1). Somit kann der Anteil der spezifischen anti-TNT-IgG zum Gesamt-IgG-Gehalt für K1B9 mit 19% und für K2B12 mit 12% abgeschätzt werden (Tab. 9.3).

*Tabelle 9.3: Bestimmung der IgG-Konzentrationen der Gesamt-IgG-Fractionen (durch Protein-A-Reinigung) und der spezifischen anti-TNT-IgG-Fractionen von K1B9 und K2B12.*

	K1B9	K2B12
IgG [mg/mL]	$4,38 \pm 0,35$	$6,68 \pm 0,37$
anti-TNT-IgG-Fraktion [mg/mL]	$0,85 \pm 0,08$	$0,81 \pm 0,06$
Prozentualer Anteil	19%	12%

Spezifische Antikörper werden durch klassische affinitätschromatographische Aufreinigung separiert. Hierzu wird üblicherweise das für die Immunisierung genutzte Hapten verwendet. Aufgrund der hohen Affinitätskonstante zwischen TNT und anti-TNT-IgG ( $5,1 \cdot 10^9$  L/mol für K1B9 bzw.  $2,3 \cdot 10^9$  L/mol für K2B12) war dies nicht möglich. Die entwickelte Strategie, eine gegenüber diesem Hapten leicht modifizierte Substanz als Liganden zu nutzen, wurde erfolgreich umgesetzt. Diese Technik kann für ähnliche Aufgabenstellungen ( $K_A > 10^8$  M<sup>-1</sup>) genutzt werden. Die auf diese Weise erhaltenen haptengereinigten Fraktionen werden für die Herstellung der Affinitätssäulen genutzt (Kap. 10.2).



*Abbildung 9.18: Schematische Darstellung der spezifischen anti-TNT-IgG-Aufreinigung mittels Haptensäule und anschließende Verwendung zur TNT-Anreicherung mittels einer aus den anti-TNT-IgG-Fractionen hergestellten TNT-Affinitätssäule.*





## 10 TNT-Affinitätssäule

Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer HPLC-tauglichen TNT-Affinitätssäule, um TNT aus Wasserproben zu isolieren. Diese könnte in der Umweltanalytik beispielsweise zur Detektion von Altlasten durch TNT-Kontaminationsbestimmungen im Grundwasser genutzt werden (Kap. 1.2.1). Zu Beginn erfolgt eine theoretische Abschätzung der TNT-Säulenkapazität. Anfangs wurden die TNT-Affinitätssäulen durch Immobilisierung der Gesamt-IgG-Fraktion (Protein-A-Reinigung, Kap. 2.2.1) hergestellt; später wurden nur spezifischen anti-TNT-IgGs verwendet. Die Problematik der Elution der stark bindenden Affinitätssäule wird aufgezeigt und mit einer denaturierenden, thermischen Online-Elution gelöst. Die Ligandendichten der hergestellten Säulen werden mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten AAAA-Verfahren bestimmt.

### 10.1 Abschätzung der Kapazität der TNT-Affinitätssäule

Um die maximale Kapazität einer TNT-Affinitätssäule zu bestimmen, sind das Volumen der Säule, die Ligandendichte sowie die Oberfläche des Trägermaterials maßgeblich. Bei der theoretischen Kapazitätsberechnung über die Ligandendichte wird jedoch der sterische Aspekt nicht berücksichtigt. So sind die TNT-Moleküle zwar klein, doch um zwei kleine TNT-Moleküle zu binden, wird zunächst ein voluminöser Antikörper an dem Affinitätsmaterial immobilisiert. Daher erfolgt eine realistischere Abschätzung der TNT-Kapazität über die Berechnung eines IgG-Monolayer auf der Oberfläche des Trägermaterials. Zur Charakterisierung der porösen Gläser wurde neben der Ligandendichte auch die Oberfläche vom Hersteller angegeben. In der Literatur findet man typische Dimensionen von IgG mit ca. 15,5 nm x 8,5 nm x 4 nm [253, 254]. Der Flächenbedarf lässt sich somit mit  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  abschätzen (Kap. 7.6.3). Daraus ergibt sich eine maximale IgG-Kapazität von Amino-Trisopor™ 1500 von 512 nmol pro g Trisopor™. Berücksichtigt man die Schüttdichte mit 0,29 g/mL und die Molmasse von IgG mit ca. 144000 g/mol, ergibt sich eine Kapazität von 21,4 mg IgG pro mL Säulenvolumen (Tab. 10.1). Diese Kapazität liegt etwas niedriger als die des angebotenen Trisopor™-Protein A (dynamische Kapazität: 25 mg IgG pro mL Säulenvolumen, statische Kapazität: 40 mg pro mL Säulenvolumen) [271]. Die Oberfläche des Trisopor™-Protein A ist nicht angegeben. Da die Partikelgröße mit 60-120 µm und der Porendurchmesser mit 60-100 nm angegeben ist, ist jedoch von einer größeren Oberfläche im Vergleich zu Amino-Trisopor™ 1500 auszugehen und somit eine höhere IgG-Kapazität zu erwarten.

Um die theoretisch maximale TNT-Kapazität auf Grundlage eines IgG-Monolayers am Trägermaterial zu berechnen, wird die doppelte Molmasse von TNT verwendet, da maximal zwei Moleküle an einem Antikörper binden können (Kap. 1.3.1):

$$\text{Kapazität(TNT)} = 2 \cdot \text{Molmasse(TNT)} \cdot \frac{\text{Oberfläche Support}}{\text{Platzbedarf IgG}} \div N_A$$

Rechnerisch ergibt sich eine maximale TNT-Kapazität von Amino-Trisopor™ 1500 von 67,1 µg pro mL Säulenvolumen. In dieser Arbeit wurden Leersäulen mit einem Volumen von 16,2 µL bzw. 64,8 µL verwendet. Eine 16,2 µL-Säule mit IgG-Monolayern an Amino-Trisopor™ 1500 von anti-TNT-Antikörpern betrage somit 1,09 µg TNT, eine 64,8 µL-Säule 4,35 µg TNT (Tab. 10.1).

*Tabelle 10.1: Theoretisch berechnete maximale IgG-Kapazität und die daraus resultierende TNT-Kapazität von Trisopor™ 1500.*

Trägermaterial	IgG-Ligandendichte [nmol] pro g Trisopor™	IgG-Ligandendichte [mg] pro mL Trisopor™	TNT-Kapazität [µg] pro mL Trisopor™	TNT-Kapazität [µg] pro Säule
Trisopor™ 1500	512	21,4	67,1	1,09 (16,2µL) 4,35 (64,8µL)

## 10.2 TNT-Affinitätssäulen mit Protein A gereinigtem anti-TNT-IgG

Die Vorversuche für die Elution der TNT-Affinitätssäulen wurden mit den zu Beginn hergestellten Affinitätssäulen durchgeführt, bei denen der gesamte IgG-Anteil mittels Protein A separiert und anschließend mit Zentrifugalfiltern (Millipore Centriprep™, cutoff 3 kDa) aufkonzentriert wurde.

### 10.2.1 Saure Elution

Bei der sauren Elution wird die Antikörper-Antigen-Bindung durch Verwendung von Säure geschwächt, sodass das Antigen gelöst wird. Wenn die Antikörper durch anschließendes Waschen des Materials mit PBS regeneriert werden können, handelt es sich um eine reversible Elution.

#### Saure Elution an der HPLC

Als Trägermaterialien wurden Sepharose™, Cellufine™ und Amino-Trisopor™ 1500 verwendet. Die TNT-Affinitätssäulen wurden an der HPLC-Anlage nach der TNT-Beladung mit PBS gewaschen und anschließend sauer eluiert. Um die Basislinie zu glätten und Verstopfungen der HPLC-Kapillaren zu vermeiden, wurde als Waschlösung nur halbkonzentrierter PBS benutzt. Der in der Affinitätschromatographie häufig verwendete Glycinpuffer absorbiert bei 230 nm, der Detektionswellenlänge für TNT. Daher wurde stattdessen 0,01 M Phosphorsäure, pH 2,26 (HPLC-grade), zur Elution verwendet. Der Durchlauf der Säule wurde fraktioniert gesammelt, sodass zusätzlich zur UV-Detektion der TNT-Gehalt der Fraktionen mittels ELISA bestimmt werden konnte.

Die Elutionsprofile zeigen deutlich die unterschiedliche Kinetik der Trägermaterialien (Abb. 10.1 und 10.2). Die TNT-Elution der kohlenhydratbasierten TNT-Affinitätssäulen erfolgen sehr langsam (breite, nicht sehr hohe Peaks), sodass die fünfminütige Elution aufgrund der langsamen Kinetik dieser Trägermaterialien nicht ausreicht, um das gebundene TNT vollständig zu lösen. Diese Trägermaterialien sind somit für eine schnelle TNT-Bestimmung ungeeignet. Des Weiteren sind diese Polymere (Gele) nicht sehr druckstabil. Daher werden diese Materialien nicht für die Entwicklung einer TNT-Online-Nachweismethode verwendet.

Die TNT-Elutionen der TNT-Affinitätssäule mit porösem Glas als druckstabilem Trägermaterial zeigt hingegen eine schnelle Kinetik, sodass es für den Einsatz an der HPLC gut geeignet ist. Die Abschätzung der TNT-Kapazität der Trisopor-basierten TNT-Affinitätssäule (64,8 µL) mithilfe der ELISA-Proben ergab 4,44 ng bzw. 19,5 pmol TNT, d. h. es wurde nur 1,0% des theoretisch berechneten IgG-Monolayers (Kap. 10.1) mit spezifischen IgG belegt.

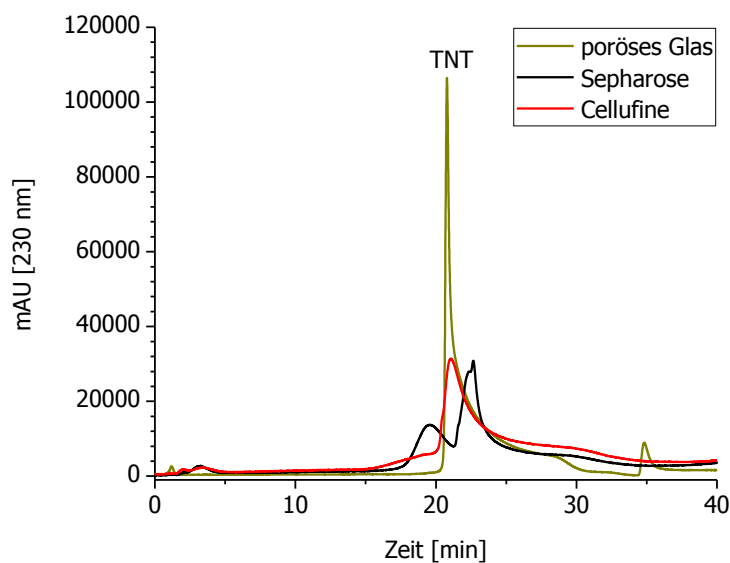


Abbildung 10.1: HPLC-Chromatogramme der TNT-Affinitätssäulen (Säulenvolumen 64  $\mu\text{L}$ ) auf Basis von Sepharose™, Cellufine™ bzw. porösem Glas (Trisopor 1500), Elution erfolgte mit 0,01 M Phosphorsäure, pH 2,26.

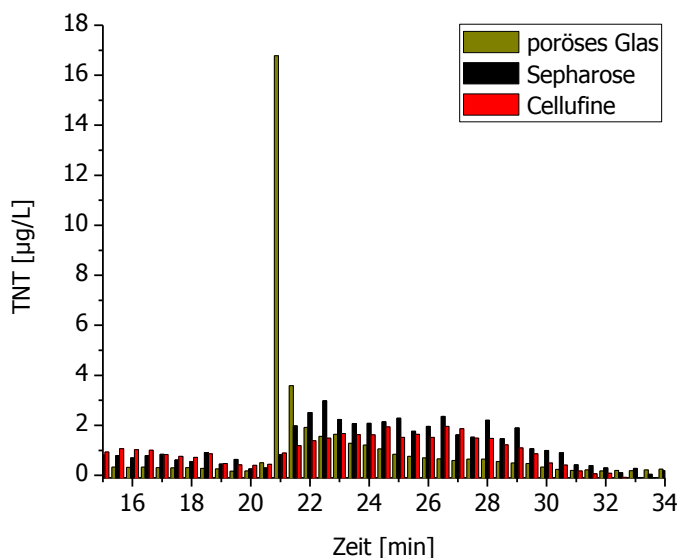


Abbildung 10.2: TNT-ELISA-Auswertung der im HPLC-Experiment (Abb. 10.1) gesammelten Fraktionen, Abschätzung der eluierten TNT-Menge der Affinitätssäule, basierend auf porösem Glas:  $(17 \mu\text{g/L} + 3,8 \mu\text{g/L} + 3 \cdot 2 \mu\text{g/L} + 3 \cdot 1 \mu\text{g/L} + 10 \cdot 0,5 \mu\text{g/L}) \cdot 0,12 \text{ mL} = 4,44 \text{ ng}$ .

### Saure Elution mit zusätzlicher Trap-Säule

Um die Elution der Affinitätssäule nochmals zu konzentrieren und TNT mittels der Retentionszeit nachzuweisen, wurde der Affinitätssäule eine C18-Säule nachgeschaltet. Nach dem Waschen wird die Affinitätssäule invers auf diese klassische analytische C18-Säule eluiert. Die Richtungsänderung empfiehlt sich, um die Bindung von Antigenen an den noch freien Antikörpern zu unterbinden, die zu Verzögerungen während der Elution führen könnten. Anschließend wird die analytische Säule mit einem Lösungsmittelgradient eluiert. Als analytische C18-Säule wurde zunächst die Vorsäule Hypersil GOLD aQ DASH HTS 20 x 2.1mm, 5  $\mu\text{m}$  benutzt. Da die Retention der Trapsäule für längere Elutionen nicht ausreicht, wurde später die stärker retardierende Hamilton PCR-C18 verwendet. Die

Ventilstellungen für die Durchführung der Online-Methode mit den Schritten 1. Beladung und Waschen  
2. Elution der Affinitätssäule und Überführung auf die analytische Säule (Trapsäule) 3. Elution der  
Trapsäule und 4. Äquilibrierung der Affinitätssäule sind in Abbildung 10.3 dargestellt.

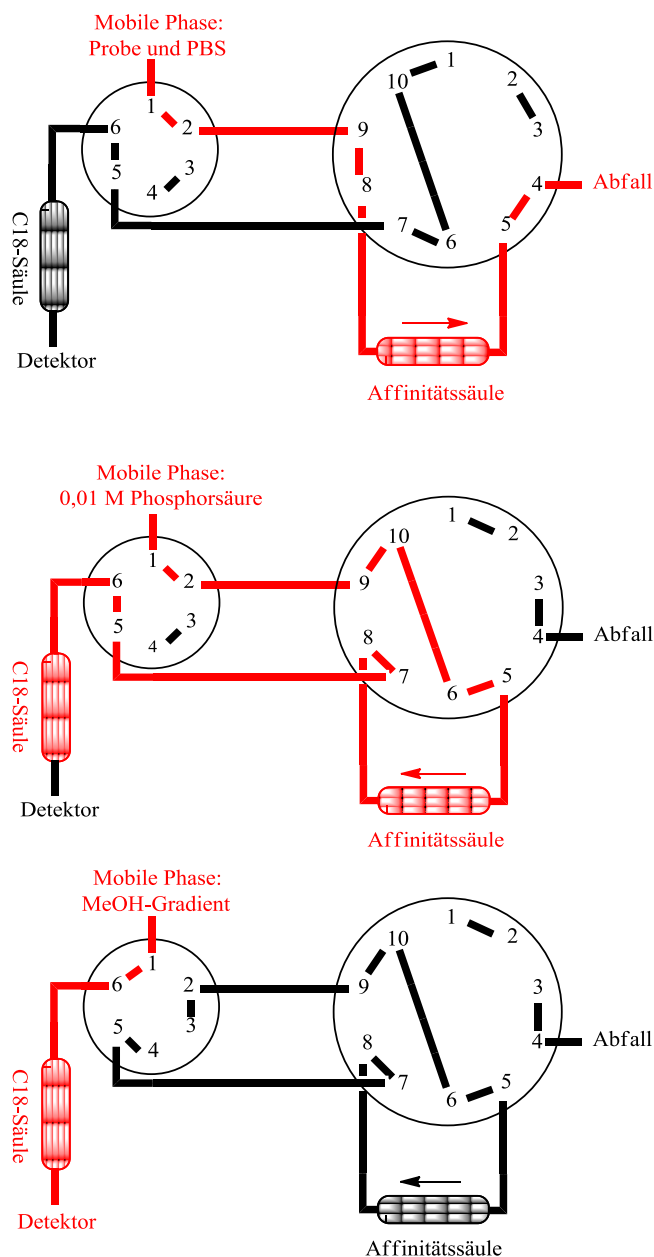


Abbildung 10.3: Ventilschaltung für die Elutionsmethode der Affinitätssäule mit Elution auf die analytische C18-Säule: 1. Beladung und Waschen der Affinitätssäule 2. Inverse Elution der Affinitätssäule, wobei TNT auf der analytischen Säule retardiert 3. Elution der C18-Säule 4. Äquilibrierung (Ventilstellung analog 1. Beladung und Waschen). Die roten Bereiche werden durchströmt.

## 10.2.2 Thermische Elution

### Saure versus thermische Elution

Da die Kapazitäten der TNT-Säulen sehr gering waren (Abb. 10.2) und die Bindungskonstanten zwischen Antigen und Rezeptor sehr hoch sind ( $5,1 \cdot 10^9$  L/mol (Kaninchen 1) bzw.  $2,3 \cdot 10^9$  L/mol (Kaninchen 2) [5], ist anzunehmen, dass durch die saure Elution das gebundene TNT nicht vollständig eluiert wurde.

Durch eine irreversible, vollständige Denaturierung der Antikörper wurde geprüft, ob noch weiteres TNT auf der Säule gebunden war. Hierfür wurde die bereits mit Säure eluierte Säule ausgebaut und für 10 min in ein heißes Wasserbad ( $> 80^\circ\text{C}$ ) gelegt. Danach wurde die abgekühlte Säule in die HPLC-Anlage eingesetzt und der Säuleninhalt der Affinitätssäule innerhalb von 5 min mit einem Fluss von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf die Trapsäule eluiert. Nach Ausbau der Affinitätssäule wurde die monolithische Trapsäule mit hohem Fluss (1,3 mL/min) und mit einem steilen Methanolgradienten eluiert. Diese Versuche wurden sowohl mit einer Cellufine™-basierten Affinitätssäule als auch mit Affinitätssäulen mit porösem Glas als Trägermaterial (Bis-NHS-Ester zur Immobilisierung) durchgeführt (Abb. 10.4 und 10.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.2 zusammengestellt.

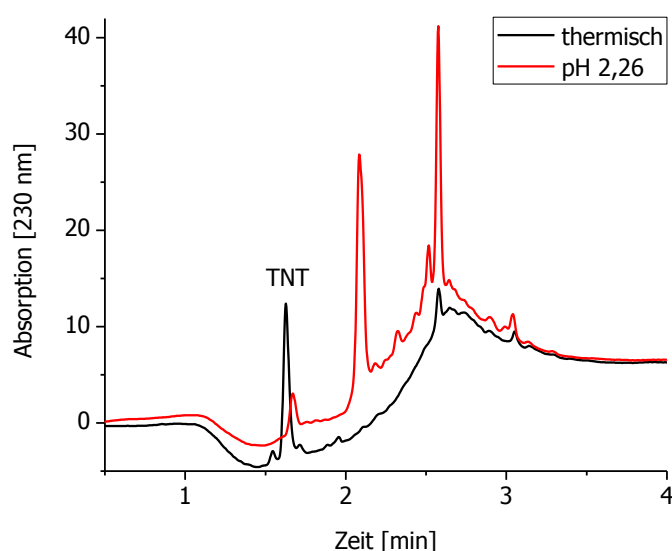


Abbildung 10.4: Chromatogramme der analytischen Säule nach der sauren und der thermischen Elution einer TNT-Affinitätssäule (Trägermaterial: Cellufine™).

Tabelle 10.2: TNT-Quantifizierung mittels der Chromatogramme der analytischen Säule nach saurer bzw. thermischer Elution der Affinitätssäulen (16,2  $\mu\text{L}$ ).

Trägermaterial, Elutionstyp	TNT-Elution (C-128-Säule) [ng]	TNT-Kapazität pro mL Trisopor™ [μg]
Cellufine™, saure Elution	3,03	0,187
Trisopor™, saure Elution	2,97	0,183
Cellufine™, thermische Elution	(11,12+3,03) = 14,12	0,872
Trisopor™, thermische Elution	(15,30+2,97) = 18,27	1,128
Trisopor™ 2*, saure Elution	1,80	0,111
Trisopor™ 2*, thermische Elution	(8,95+1,80) = 10,75	0,664

\* wurde nicht in dem Chromatogramm Abb. 10.5 dargestellt

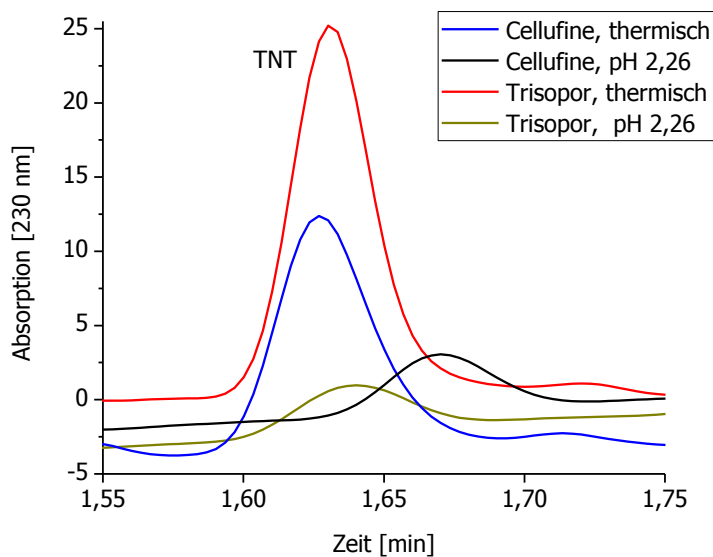


Abbildung 10.5: TNT-Peaks der Chromatogramme der analytischen Säule nach saurer und anschließender thermischen Elution der Affinitätssäulen, basiert auf den Trägermaterialien Cellufine™ und Trisopor™.

Die thermische Elution führt zu einem deutlich höheren (4-5-fachen) TNT-Peak als die saure Elution. Somit ist die saure Elution für ein analytisches Verfahren nicht nutzbar, da eine vollständige Rückgewinnung des Analyten gewährleistet werden muss. Die Bindung zwischen Analyt und Antikörper ist jedoch so stark, dass durch Säureeinwirkung nur ein Sechstel der TNT-Menge wiedergefunden wurde. Um ein analytisches Verfahren zu entwickeln, wird daher eine irreversible Denaturierung verwendet.

### Transfer von der Affinitätssäule auf die C18-Säule

Bevor die Elution der C18-Säule erfolgt, muss sichergestellt werden, dass alle von der Affinitätssäule gelösten TNT-Moleküle auf die Trapsäule gelangen. Um die Menge des hierfür benötigten Laufmittels zu bestimmen, wird eine mit TNT beladene und mit PBS gewaschene TNT-Affinitätssäule thermisch eluiert (64,8  $\mu$ L, Trisopor™), indem sie nach 10-minütigen Erhitzen tropfenweise mit PBS gespült wird. Der Durchfluss wird fraktioniert (20  $\mu$ L je Well) auf einer vorbereiteten TNT-ELISA-Platte aufgefangen und ausgewertet (Abb. 10.6). Nach ca. 140  $\mu$ L ist kein TNT mehr im Durchfluss nachweisbar. Somit reicht eine Menge von 140  $\mu$ L zur vollständigen Überführung der TNT-Probe von der Affinitätssäule auf die analytische Säule.

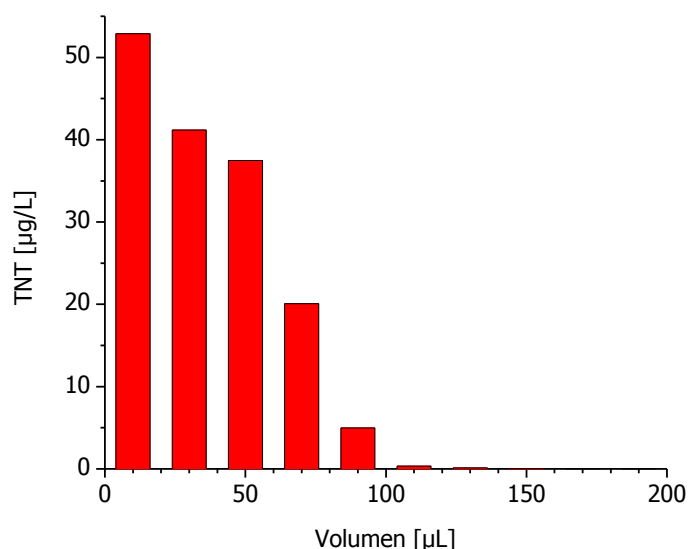


Abbildung 10.6: Thermische Elution einer TNT-Affinitätssäule (C-135-Säule mit einem Volumen von 64,8 µL), TNT-Menge wurde mittels ELISA nachgewiesen.

### Einfluss der IgG-Menge auf die TNT-Kapazität

Um zu überprüfen, ob die Konzentration der zu immobilisierenden IgG-Lösung ausschlaggebend für die spätere TNT-Kapazität der Affinitätssäule ist, wurden zur Herstellung der TNT-Affinitätsmaterialien unterschiedlich konzentrierte anti-TNT-IgG-Lösungen bzw. unterschiedliche Volumen gleicher Konzentration verwendet. Als Blindprobe wurde normales Kaninchen-IgG statt anti-TNT-IgG gekoppelt, um das Ausmaß der unspezifischen TNT-Bindung zu untersuchen. Als Trägermaterial wurde poröses Glas und zur Immobilisierung wurde die Bis-NHS-Methode verwendet.

Die Säulen wurden mit den entsprechenden Materialien gefüllt, vollständig mit TNT beladen, gewaschen und thermisch eluiert. Die TNT-Kapazitäten der Säulen wurden anhand der Elutionen der C18-Säule bestimmt (Abb. 10.7). Die aus den TNT-Peaks berechneten Kapazitäten befinden sich in Tabelle 10.3. Die Korrelation zwischen der anti-TNT-IgG-Menge, die zur Immobilisierung verwendet wurde, und der TNT-Kapazität der entsprechenden Säule wird in Abbildung 10.8 verdeutlicht.

Tabelle 10.3: TNT-Kapazitäten der Affinitätssäulen (Volumen: 16,2 µL), an denen unterschiedliche IgG-Mengen immobilisiert wurden.

Antikörperlösung, die zur Immobilisierung an 40 mg Matrix benutzt wurde	Zur Immobilisierung (an 40 mg Matrix) genutztes IgG [mg]	TNT-Kapazität der Säule [ng]
10,0 mg/mL (0,10 mL) Kaninchen-IgG	1,0 Kaninchen-IgG	0,46
1,6 mg/mL (0,10 mL) K1B9-IgG	0,162 K1B9-IgG	1,89
1,6 mg/mL (0,20 mL) K1B9-IgG	0,320 K1B9-IgG	3,19
13,9 mg/mL (0,08 mL) K1B9-IgG	1,112 K1B9-IgG	(8,95+1,80)* = 10,75
23,25 mg/mL (0,08 mL) K1B9-IgG	1,859 K1B9-IgG	(15,30+2,97)* = 18,27

\* thermische plus saure Elution

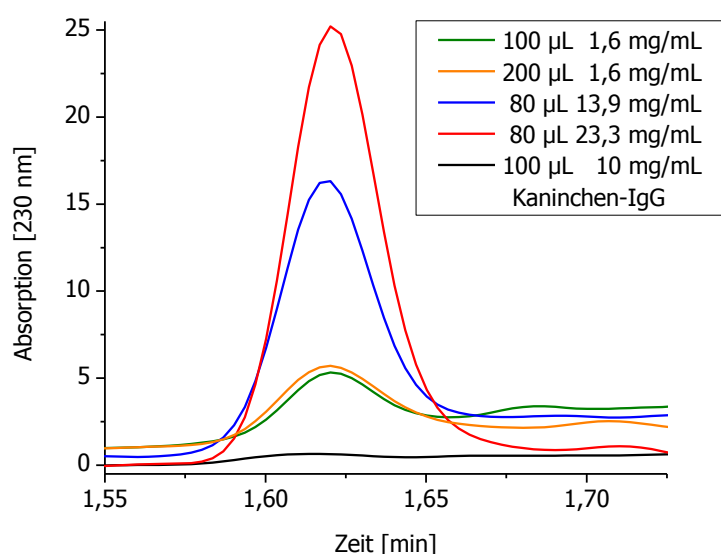


Abbildung 10.7: TNT-Peaks aus den HPLC-Chromatogrammen der C18-Säule, nach thermischer Elution der TNT-Affinitätssäulen (poröses Glas), welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von K1B9-IgG (Protein A gereinigt) hergestellt wurden.

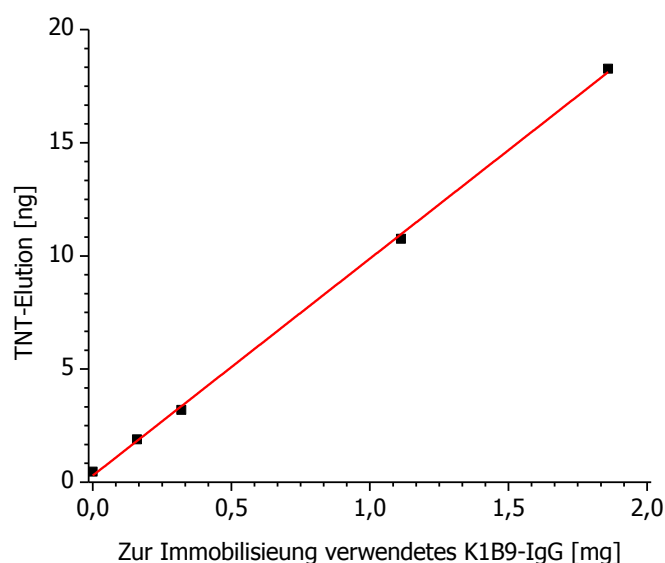


Abbildung 10.8: K1B9-IgG-Menge, die zur Immobilisierung an 40 mg Trisopor™ 1500 verwendet wurde, versus TNT-Elution der entsprechenden TNT-Affinitätssäule (16,2 µL).

Die unspezifische TNT-Bindung ist bei den nach diesem Verfahren hergestellten Säulen nur sehr schwach ausgeprägt (0,46 ng TNT). Die Kapazität der TNT-Affinitätssäule korreliert linear mit der zur Immobilisierung verwendeten IgG-Menge (Abb. 10.8). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Auswertung der Integration des TNT-Peaks der Affinitätssäule, die mit der kleinsten IgG-Menge (100 µL, 1,6 mg/mL) immobilisiert wurde, durch eine Überlagerung mit einem Nebenpeak fehlerbehaftet sein kann.

Bei allen bisher hergestellten TNT-Affinitätssäulen ist die maximale TNT-Kapazität sehr gering im Vergleich zu der theoretisch möglichen (anti-TNT-IgG-Monolayer). Da zur Immobilisierung die gesamte IgG-Fraktion genutzt wurde, die aus der Protein-A-Reinigung gewonnen wurde, wurden alle



Antikörper an dem Affinitätsmaterial immobilisiert. Doch richtet sich nur ein Bruchteil der Antikörper der Gesamt-IgG-Menge spezifisch gegen TNT. Somit sind bei den bisherigen Affinitätsmaterialien eine Vielzahl der Bindungen mit nicht spezifischen IgG besetzt worden. Um die Kapazität zu steigern, wurden im Folgenden für die Herstellung der TNT-Affinitätssäulen nur noch spezifische anti-TNT-IgG-Fractionen verwendet, die durch Haptenreinigung der Seren isoliert wurden (Kap. 9).

### **10.3 Affinitätssäule mit haptengereinigtem anti-TNT-IgG**

Da die Vorteile des porösen Glases bereits herausgearbeitet wurden, werden die spezifischen Antikörper, die durch Separierung an der eigens entwickelten Affinitätssäule (Kap. 9.2.5) gewonnen wurden, ausschließlich an diesem Material immobilisiert. Aufgrund der größeren Oberfläche und der homogenen Teilchengrößenverteilung wird Amino-Trisopor™ 1500 verwendet. Die höchste Ligandendichte wurde mit der Glutaraldehyd-Methode erreicht (Kap. 8.3.6).

Die Affinitätssäulen wurden nach zwei verschiedenen Varianten hergestellt. Entweder wurden die Antikörper in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß an das Affinitätsmaterial immobilisiert und anschließend nass in die Säulen befüllt (Verdichtung mittels HPLC) oder die Säulen wurden trocken mit dem Trägermaterial gefüllt und die Antikörper auf dem gepackten Trägermaterial immobilisiert. Bei Verwendung der ersten Variante können mehrere Säulen mit identischen Affinitätsmaterial gefüllt werden, während beim zweiten Verfahren die anti-TNT-IgG-Menge optimal genutzt wird, um hohe Kapazitäten zu erzielen, da die Trägermaterialmenge dem Säulenvolumen exakt angepasst ist. Bei der Variante 2 (Trockenfüllung) können sich jedoch Luftkanäle bilden, die sich auch durch anschließende Druckausübung mittels HPLC nicht verdichten lassen. Dies kann dazu führen, dass TNT trotz ausreichender Säulenkapazität während der Beladung nicht zu 100% am Affinitätsmaterial bindet, da ein Teil der TNT-Moleküle am Affinitätsmaterial vorbeigeleitet wird. Bei diesen schlecht gepackten Säulen ist stets ein Bruchteil (1-2%) der TNT-Probe im Durchfluss nachweisbar. Somit ist die erste Variante – separates Herstellen des Affinitätsmaterials vor der Säulenfüllung – favorisiert, zumal während des Immobilisierungsprozesses eine bessere Durchmischung der Komponenten gewährleistet ist (Immobilisierung auf dem Schüttler).

#### **10.3.1 Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel**

Ein Ziel dieser Arbeit ist – außer der reinen Herstellung der Affinitätssäule –, eine vollständige Methode zur systematischen Verwendung, d. h. eine Online-Elutions-Methode zu entwickeln. Aus den Vorexperimenten mit den TNT-Affinitätssäulen (Kap. 10.2) wurde deutlich, dass nur eine komplette Denaturierung der Antikörper zu einer vollständigen TNT-Elution führt.

Als Denaturierungsoption für eine Online-Methode wurde zunächst eine Denaturierung mit reinem Lösungsmittel getestet. Die exakte Methode der TNT-Elution ist in Tabelle 5.1 aufgeführt. Der Aufbau mit den Anschlüssen an der HPLC-Anlage ist in Abbildung 10.9 zu sehen. Die entsprechenden Ventilstellungen der verschiedenen Schritte sind in den Abbildungen 10.10 bis 10.12 dargestellt. Zu Beginn wird die Säule über eine externe Pumpe mit der TNT-Probe beladen und mit PBS gewaschen (Abb. 10.10). Um unspezifisch gebundene Moleküle zu entfernen, wurde für den Waschprozess zwischenzeitlich (4 min) PBS mit einem 20%-igen MeOH-Anteil verwendet.

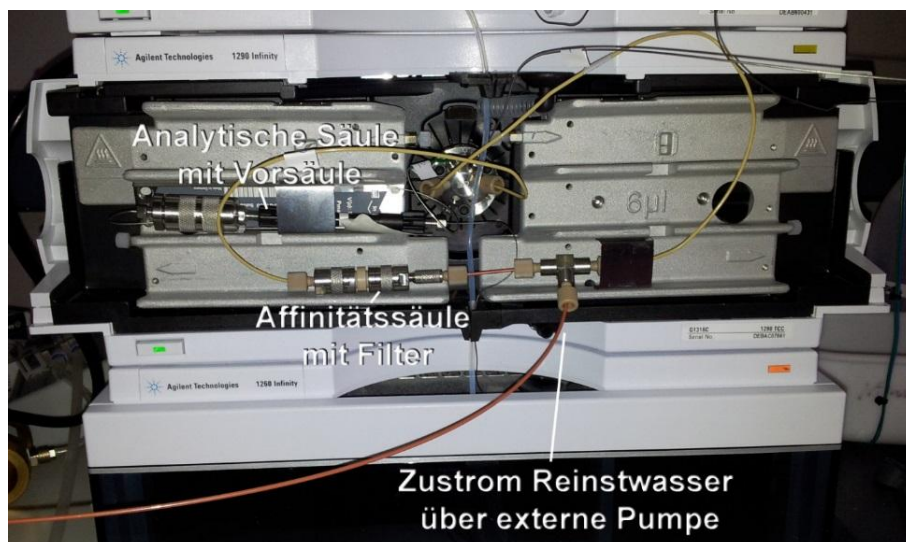


Abbildung 10.9: Aufbau der HPLC-Anlage für die Online-Elution (Tab. 5.1) mittels Denaturierung durch 100% Lösungsmittel (Methanol).

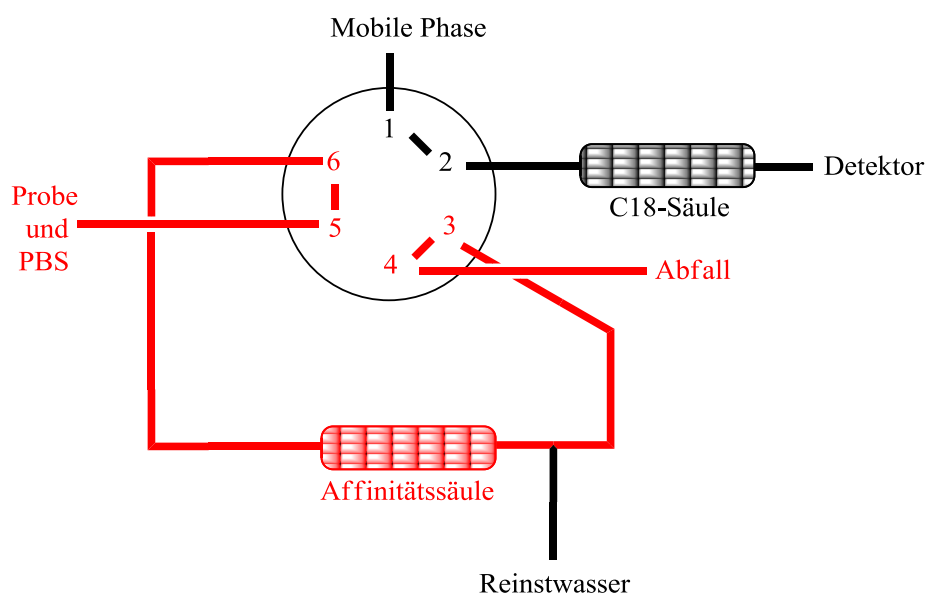


Abbildung 10.10: Erster Schritt der Online-Methode (Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel): TNT-Beladung und Waschen (PBS) der Säule über eine externe Pumpe (Ventilstellung 1→2). Der Bereich, der in diesem Schritt durchflossen wird, wurde rot markiert.

Zur Denaturierung wurde 100% MeOH verwendet (Flussgeschwindigkeit 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Um TNT auf der C18-Säule retardieren zu können, wird eine weitere externe Pumpe (HPLC-Pumpe) benötigt, die zwischen Affinitätssäule und C18-Säule geschaltet wird. Diese pumpt Reinstwasser zur Verdünnung des Lösungsmittelstroms (Flussgeschwindigkeit 570  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), sodass die mobile Phase bei Erreichen der C18-Säule nur noch einen 5%-igen MeOH-Anteil aufweist. Unter diesen Bedingungen kann TNT auf der analytischen Säule gehalten werden (Abb. 10.11).

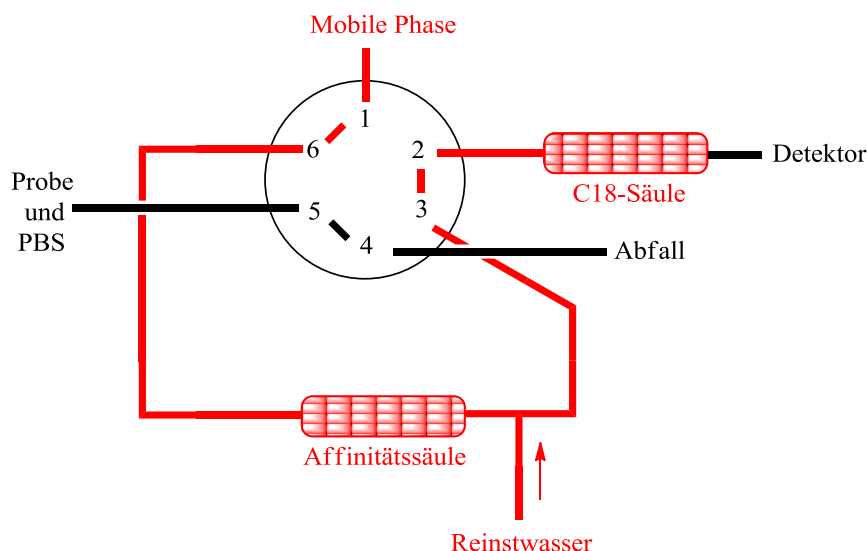


Abbildung 10.11: Zweiter Schritt der Online-Methode (Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel): Denaturierung der Antikörper mit 100% MeOH (30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) und zusätzlicher Zustrom an Reinstwasser (570  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) um TNT auf der analytischen Säule zu halten (Ventilstellung 1 $\rightarrow$ 6).

Um TNT zu identifizieren und zu quantifizieren, erfolgt abschließend die Elution der analytischen Säule mittels eines ACN-Gradienten (Abb. 10.12).

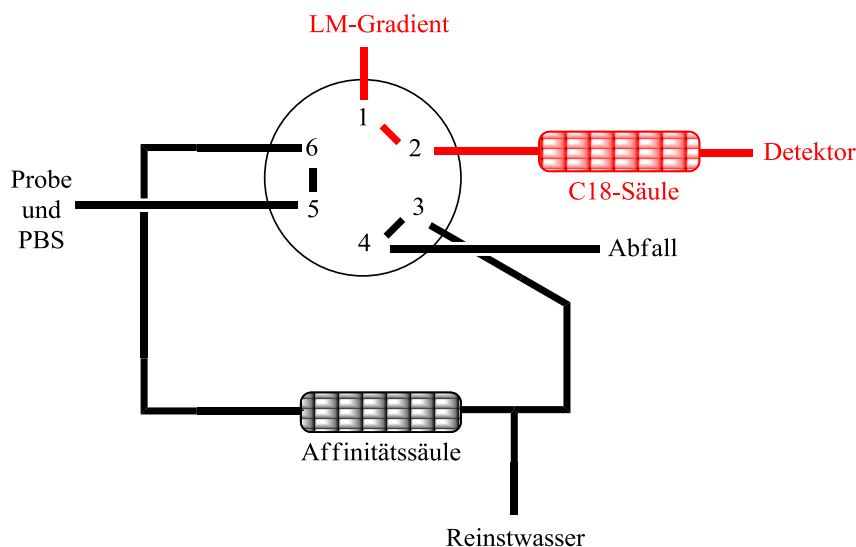


Abbildung 10.12: Dritter und letzter Schritt der Online-Methode (Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel): TNT-Detektion mit Hilfe eines ACN-Gradienten (Ventilstellung 1 $\rightarrow$ 2).

Die Methode wurde sowohl mit einer TNT-Affinitätssäule (mit haptengereinigten anti-TNT-IgG) getestet als auch mit einer Säule, an der lediglich BSA immobilisiert wurde (beide Immobilisierungen via Bis-NHS-Ester-Methode). Schon das Chromatogramm (Abb. 10.13) der BSA-Säule zeigte eine Vielzahl an eluierten Substanzen, die bei 230 nm absorbieren. Die hohe Intensität der Signale, die von den unerwünschten Substanzen hervorgerufen wurde, lässt auf eine hohe Konzentration der Stoffe schließen, die durch diese Elutionsmethode zusätzlich gelöst wurden. Der zusätzliche TNT-Peak der durch die Elution der TNT-Affinitätssäule erzeugt wurde, ist deutlich zu erkennen, jedoch ist eine Quantifizierung schlecht möglich, da dieses Verfahren keine gute Basislinie liefert. Zusatzpeaks sind sowohl bei der TNT-Säule als auch bei der BSA-Vergleichssäule im Chromatogramm zu sehen. Auch

können zusätzliche Peaks, die unter dem TNT-Hauptpeak liegen das Ergebnis verfälschen. Diese Methode ist somit nicht als Analysemethode zur Quantifizierung geeignet. Ein weiterer Schwachpunkt des Verfahrens ist, dass die analytische Säule und die HPLC-Anlage durch die zusätzlich gelösten Stoffe verschmutzt werden könnte.

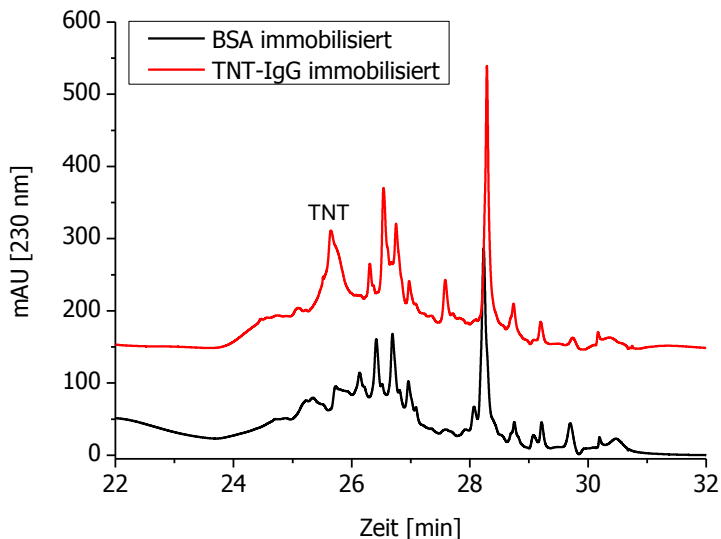


Abbildung 10.13: Chromatogramme der analytischen Säule nach einer irreversiblen Elution (Denaturierung mittels 100% MeOH) einer TNT-Affinitätssäule (via Bis-NHS-Methode) und einer Vergleichssäule, an die BSA (ebenfalls via Bis-NHS-Ester-Methode) immobilisiert wurde.

### 10.3.2 Thermische Online-Elution

Als alternative Methode wurde eine thermische Online-Methode entwickelt, um zu prüfen, ob so weniger Verunreinigungen gelöst werden. Hierfür wurde ein schnell regulierbarer Heizofen benötigt, der rasch auf hohe Temperatur erhitzt und anschließend schnell abgekühlt werden kann. Die Konstruktion des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Säulenofens ist in Abbildung 10.14 zu sehen. Die detaillierten Konstruktionszeichnungen für den Säulenofen mit Mantel und Deckel sind im Anhang zu finden. Die Säule wird in den Ofen eingespannt. Zum Erhitzen der Säule wird heißes Wasser ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) durch den Mantel gepumpt.

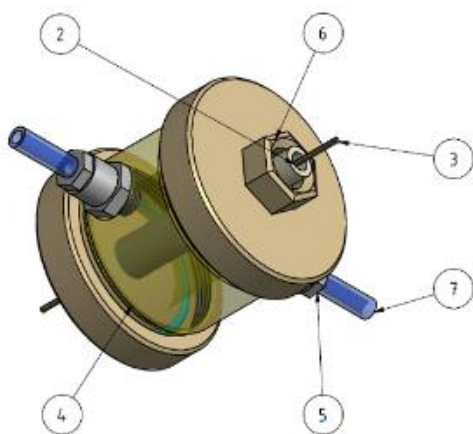


Abbildung 10.14: Konstruktionsplan des Säulenofens zur thermischen Online-Elution der TNT-Affinitätssäule (Säule innenliegend, 2 Fitting, 3 Kapillarschlauch, 4 Mantel, 5 Geradverbinder, 6 Deckel, 7 Wasserschlauch).

Um das Verfahren der thermischen Elution mit dem Säulenofen zu testen, wurde die Affinitätssäule mittels einer Spritzenpumpe mit einer verdünnten TNT-Lösung mit TNT beladen und anschließend mit PBS gewaschen. Nach der thermischen Denaturierung wurde der Säuleninhalt der Affinitätssäule mit niedrigem Fluss auf die analytische C18-Säule geleitet. Abschließend erfolgte die Elution der C18-Säule über einen ACN-Gradienten (Methode in Tab. 5.2).

Im ersten Experiment wurde die Affinitätssäule (Immobilisierung mittels Glutaraldehyd-Methode) im Säulenofen 5 min lang mit heißem Wasser ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) erhitzt. In dem resultierenden Chromatogramm (Abb. 10.15) sind mehrere Signale zu sehen. Um den TNT-Peak im Chromatogramm zu verifizieren, wurde eine TNT-Referenzprobe gemessen. Der Doppelpeak in Abbildung 10.15 besitzt eine größere Retentionszeit als TNT, sodass es sich um eine Verunreinigung handeln muss. Somit ist kein TNT-Peak auszumachen. Bei höheren ACN-Konzentrationen wurden weitere Verunreinigungen detektiert, die jedoch im Vergleich zur Methode durch Denaturierung mit Lösungsmittel sehr gering sind.

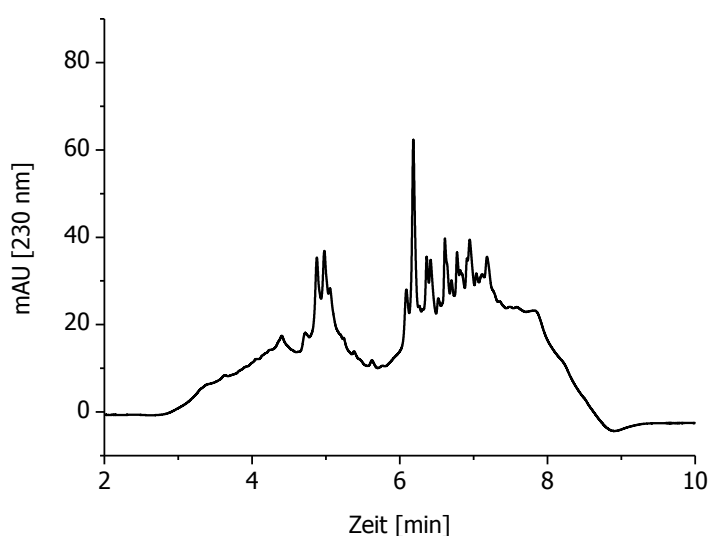


Abbildung 10.15: Chromatogramm der analytischen Säule nach der thermischen Elution (Säulenofen wurde 5 min erhitzt).

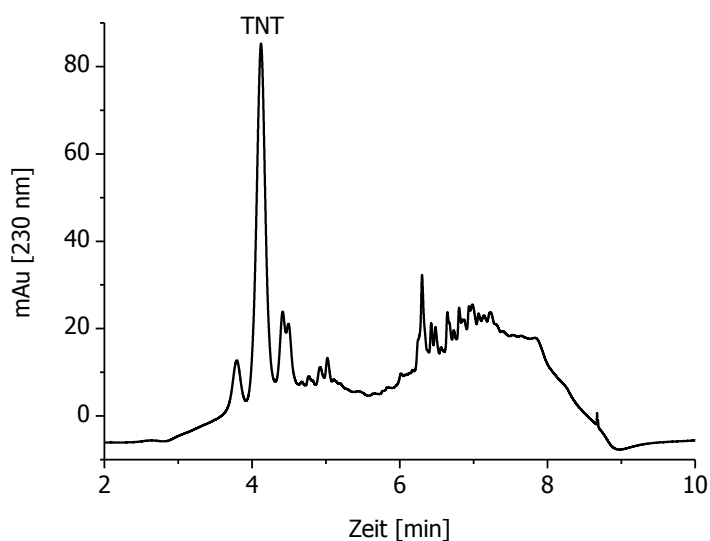


Abbildung 10.16: Chromatogramm der analytischen Säule nach der thermischen Elution (Säulenofen wurde 18 min erhitzt).

Bei Verlängerung der thermischen Behandlung von 5 min auf 18 min ist ein deutliches Signal zu beobachten (Abb. 10.16). Aufgrund der Fläche des TNT-Peaks in Abbildung 10.16 lässt sich die TNT-Kapazität der zuvor voll beladenen Säule (16,2  $\mu\text{L}$ ) mit 20,9 ng TNT abschätzen.

Der Aufbau der im nächsten Experiment verwendeten Online-Methode ist in Abbildung 10.17 zu sehen. Vor und nach der Affinitätssäule werden zwei Filter zum Schutz der HPLC-Anlage montiert, um eventuell sich lösende Partikel abzufangen. Die Teilschritte der Online-Methode sind schematisch in Abbildung 10.18 bis 10.21 dargestellt. Das Laden (mit TNT) und Waschen (mit PBS) der Affinitätssäule (Abb. 10.18) erfolgt über eine zusätzliche Pumpe.



Abbildung 10.17: Aufbau der HPLC-Anlage für die thermische Online-Methode.

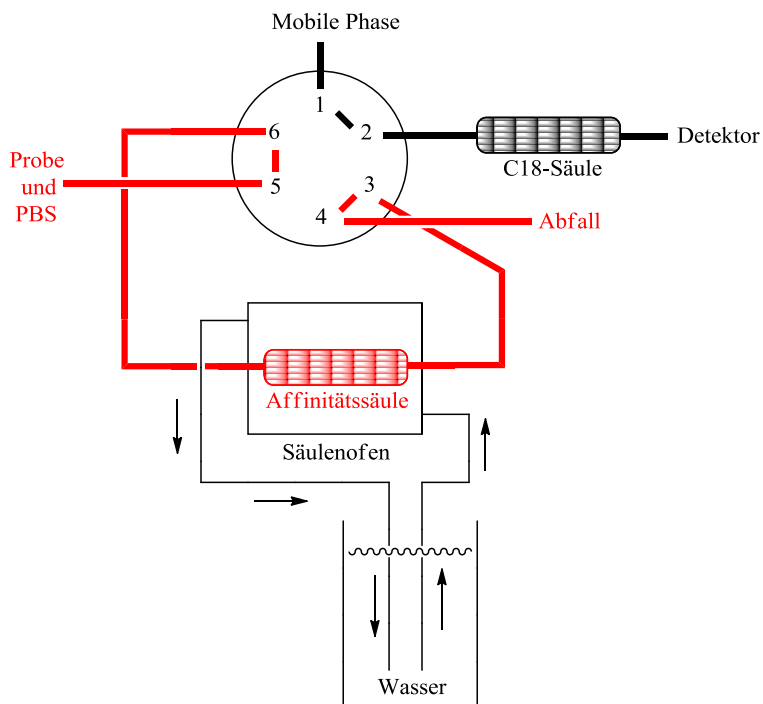


Abbildung 10.18: Erster Schritt der thermischen Online-Methode: Beladen und Waschen der Affinitätssäule (Ventilstellung 1→2).

Anschließend wird der Fluss gestoppt und die Säule 20 min erhitzt, indem heißes Wasser ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) durch den Mantel gepumpt wird (Abb. 10.19).

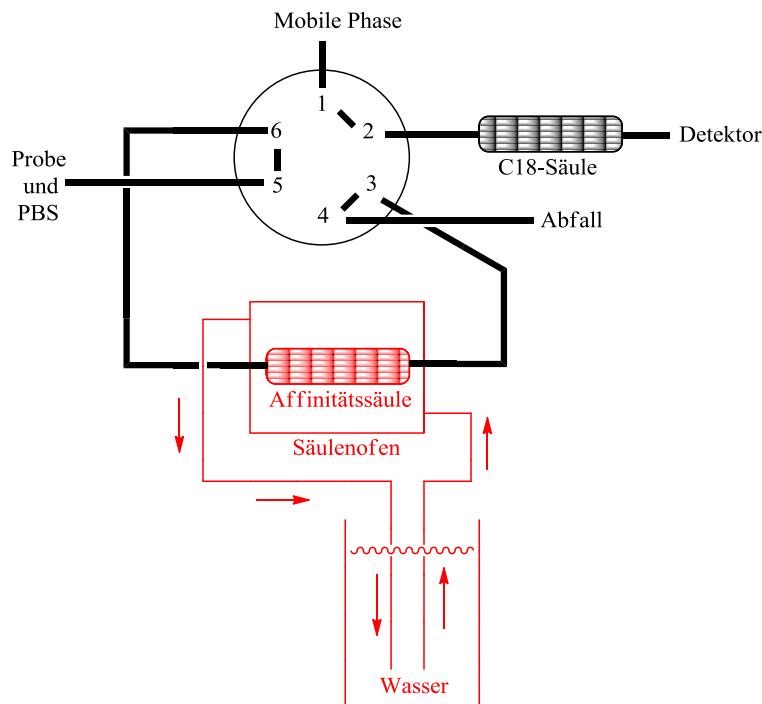


Abbildung 10.19: Zweiter Schritt der thermischen Online-Methode: Heißes Wasser ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ) wird 20 min lang durch den Mantel gepumpt, um die Antikörper auf der Affinitätssäule zu denaturieren (der Fluss der HPLC-Pumpe wird gestoppt).

Nach der Denaturierung der Antikörper wird der Inhalt der Affinitätssäule mit Reinstwasser (1,5 min, Fluss  $0,1\text{ mL/min}$ ) auf die monolithische C18-Säule überführt (Abb. 10.20).

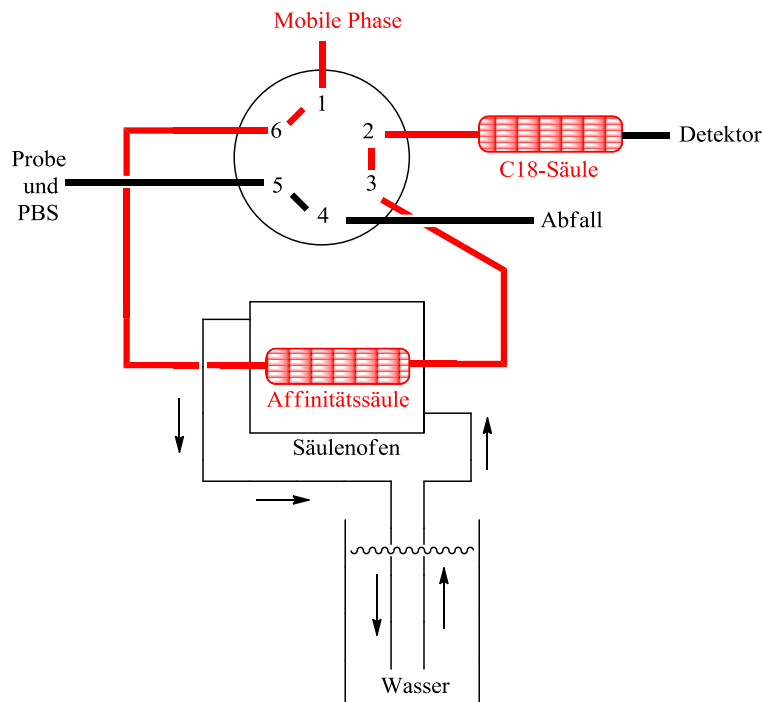


Abbildung 10.20: Dritter Schritt der thermischen Online-Methode: Nach der Denaturierung der Antikörper wird der Inhalt der Affinitätssäule mit Reinstwasser (1,5 min, Fluss  $0,1\text{ mL/min}$ ) auf die monolithische C18-Säule überführt (Ventilstellung 1 $\rightarrow$ 6).

Im vierten und letzten Schritt erfolgen die TNT-Elution der C18-Säule mit Hilfe eines ACN-Gradienten und die Detektion mittels DAD-Detektor (Abb. 10.21).

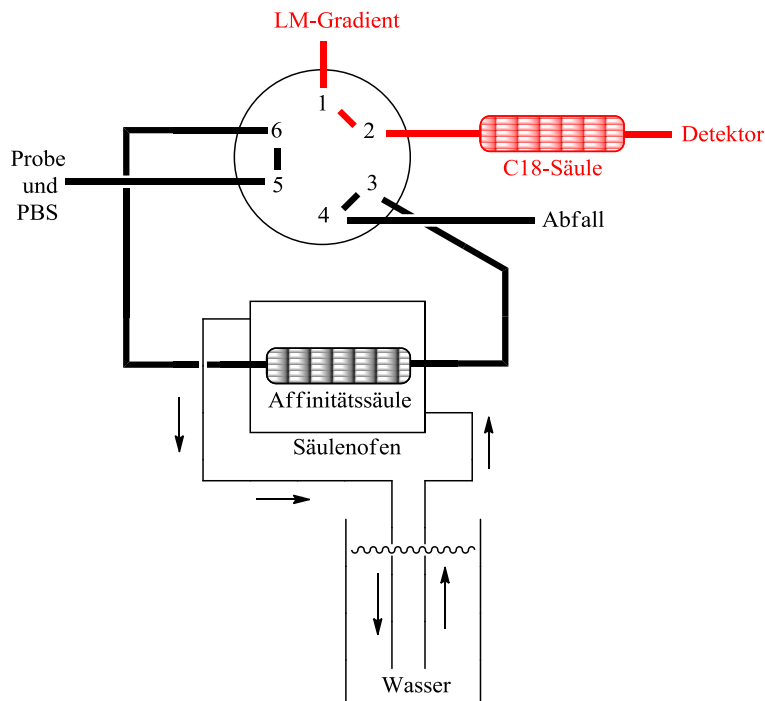


Abbildung 10.21: Vierter Schritt der thermischen Online-Methode: Durch Umstellen des Ventils (1→2) erfolgt im letzten Schritt die TNT-Detektion mit Hilfe eines ACN-Gradienten.

Um die komplette Methode zu prüfen, wurde eine TNT-Säule (64,8  $\mu\text{L}$ ) mit hoher Kapazität hergestellt. Die Leersäule wurde trocken gefüllt und die Immobilisierung mit anti-TNT-IgG (hapten-gereinigt) erfolgte mittels Glutaraldehyd-Methode. Anhand der Durchbruchskurve (ausgewertet mittels ELISA) wurde eine Säulenkapazität von 93 ng TNT ermittelt (Abb. 10.22).

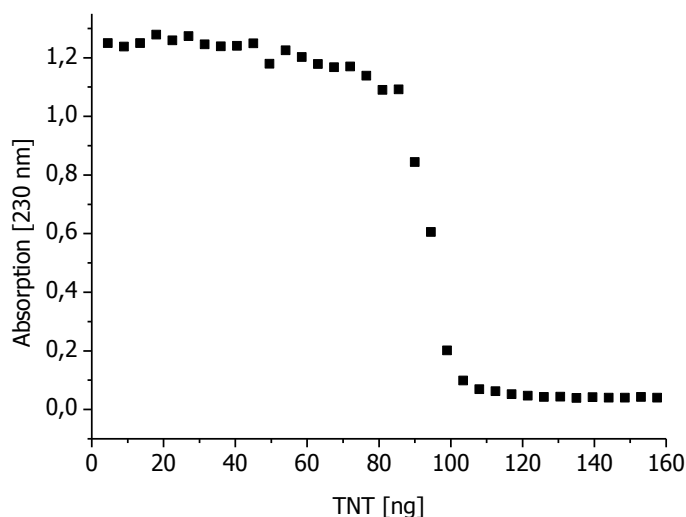


Abbildung 10.22: Durchbruchskurve einer TNT-Affinitätssäule (16,2  $\mu\text{L}$ ) mit porösem Glas als Trägermaterial, Detektion mittels ELISA.



Das Chromatogramm der thermischen Online-Elution zusammen mit einer TNT-Referenzprobe ist in Abbildung 10.23 zu sehen. Hier sind drei stärkere Signale zu sehen, ein Doppelpeak und ein größerer Einzelpeak, bei dem es sich wahrscheinlich um TNT handelt. Die TNT-Retentionszeit der Probe entspricht nicht exakt der der TNT-Referenzprobe, was auf die erhöhte Temperatur des Lösungsmittels nach Passieren der erhitzten Affinitätssäule zurückzuführen ist. Bei höheren Temperaturen nimmt nicht nur die Viskosität ab, auch ändern sich die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Lösungsmittel [272], sodass eine Verkürzung der Retentionszeiten bei erhöhten Temperaturen zu erwarten ist. Die TNT-Referenzprobe wurde ohne Erhitzen bei RT gemessen. Der beobachtete Doppelpeak (Verunreinigung) stört die Auswertung, da der TNT-Peak dadurch nicht mehr basisliniengetrennt vorliegt. Aufgrund der Fläche des Maximalpeaks lässt sich die TNT-Menge und somit die Säulenkapazität mit ca. 90 ng TNT abschätzen (Abb. 10.23).

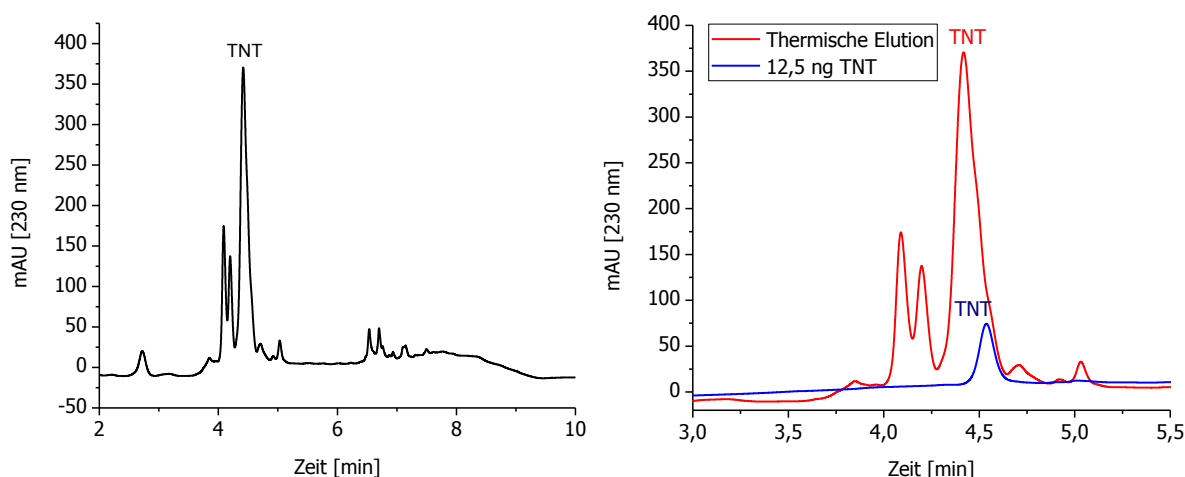


Abbildung 10.23: Gesamtchromatogramm und Ausschnitt (3-5,5 min) der analytischen Säule nach der thermischen Online-Elution einer TNT-Affinitätssäule, TNT-Referenz-Lösung (rechts, blau).

Um eine Übereinstimmung der TNT-Retentionszeit zu erreichen, wird die erhitzte Affinitätssäule vor dem Überleiten des Säuleninhalts auf die C18-Säule auf RT abgekühlt, indem der thermischen Denaturierung (20 min mit heißem Wasser,  $> 80^{\circ}\text{C}$ ) eine Abkühlphase nachgeschaltet wird, bevor die HPLC-Detektion gestartet wird (5 min Abkühlung mit Eiswasser und 5 min mit Wasser, RT).

Die spezifische TNT-Bindung der TNT-Affinitätssäule wurde wie bei der Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel durch den Vergleich mit einer BSA-Säule überprüft. Dazu wurden beide Säulen (Immobilisierung via Glutaraldehyd-Methode) mit der gleichen Menge TNT beladen, gewaschen, thermisch eluiert und ausgewertet (Abb. 10.24).

Die bei der thermischen Elution auftretenden zusätzlichen Verunreinigungen sind deutlich geringer als bei der Lösungsmittelmethode. Jedoch ist im Bereich des TNT-Peaks noch ein weiterer Peak detektiert worden, dessen Ursache in der Immobilisierungsmethode begründet sein kann. Die Glutaraldehyd-Methode führt zwar zu den höchsten Ligandendichten, jedoch können bei dieser Methode auch Nebenprodukte (z. B. Abb. 2.11 und Abb. 2.12) entstehen, die zum Auftreten weiterer Peaks führen könnten.

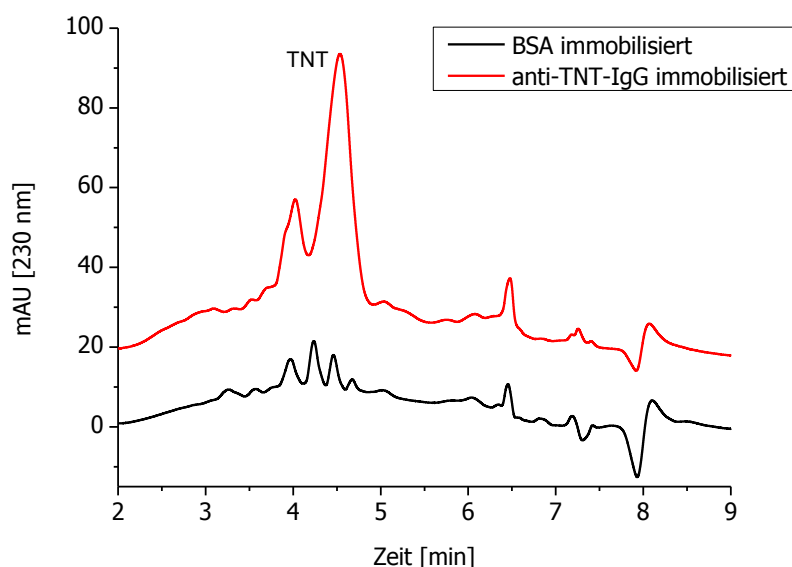


Abbildung 10.24: Chromatogramme der analytischen Säule nach der thermischen Elution der TNT-Affinitätssäule und der BSA-Säule.

Daher wurde die Bis-NHS-Ester-Immobilisierung für die Herstellung der nächsten Affinitätssäule verwendet (Säulenvolumen 64,8  $\mu\text{L}$ , gefüllt mit Affinitätsmaterial, hergestellt aus 20 mg Amino-Trisopor™, 100  $\mu\text{L}$  8,99 mg/mL anti-TNT-IgG-Lösung, K2B12, haptengereingt). Die thermische Elution führte zu einem Hauptpeak (TNT-Peak) ohne Nebenpeaks (Abb. 10.25). Die HPLC-Methode wurde nochmals verifiziert, indem nun ein geradliniger, steiler ACN-Gradient bis 95% verwendet wird. Der Fluss wurde von 1 mL/min auf 0,5 mL/min reduziert, um den schnell zunehmenden Druckanstieg zu unterbinden, der zu Undichtigkeiten bei den Fittings führte (Methode in Tab. 5.3).

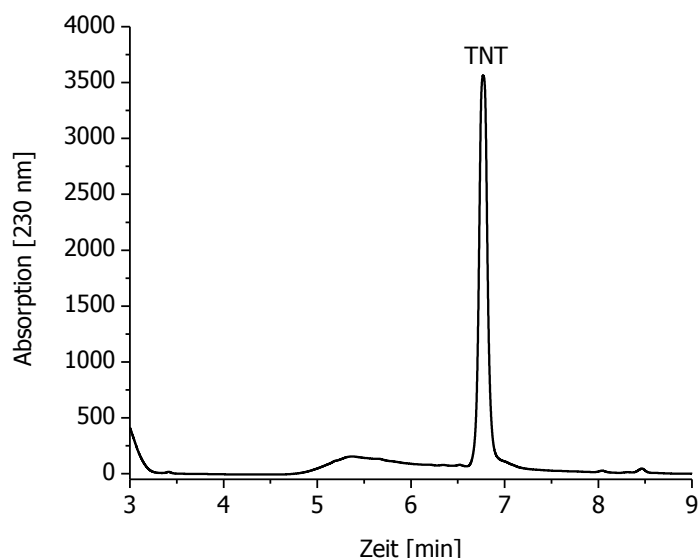


Abbildung 10.25: Chromatogramm der analytischen Säule nach der thermischen Online-Elution einer gesättigten TNT-Affinitätssäule (Säulenvolumen 64,8  $\mu\text{L}$ , Immobilisierung via Bis-NHS-Methode) unter Verwendung der in Tabelle 5.3 aufgeführten Methode.

Um die eluierte TNT-Menge abzuschätzen, wurden TNT-Vergleichsproben gemessen. Da bei Verwendung einer kleinen Durchflussszelle (Agilent Bio Max-Light Cell 60 mm, G5615-60017) die TNT-

Bestimmung bei 230 nm aufgrund der hohen Intensität nicht möglich war (geschätzter Messbereich für TNT bei 230 nm: 5-500 ng), wurde die TNT-Menge über die Detektion bei der Wellenlänge 260 nm ausgewertet (Abb. 10.26).

Bei der Auftragung der TNT-Menge versus TNT-Peakfläche in Abbildung 10.27 wird die Linearität der Quantifizierung bei 260 nm gegenüber der bei 230 nm für höhere TNT-Mengen (über 400 ng) deutlich. Die eluierte TNT-Menge aus Abbildung 10.25 beträgt 650 ng, d. h. die TNT-Kapazität dieser Säule (64  $\mu$ L) ist 650 ng oder 10,0 mg bzw. 44,2  $\mu$ mol TNT pro L Säulenvolumen.

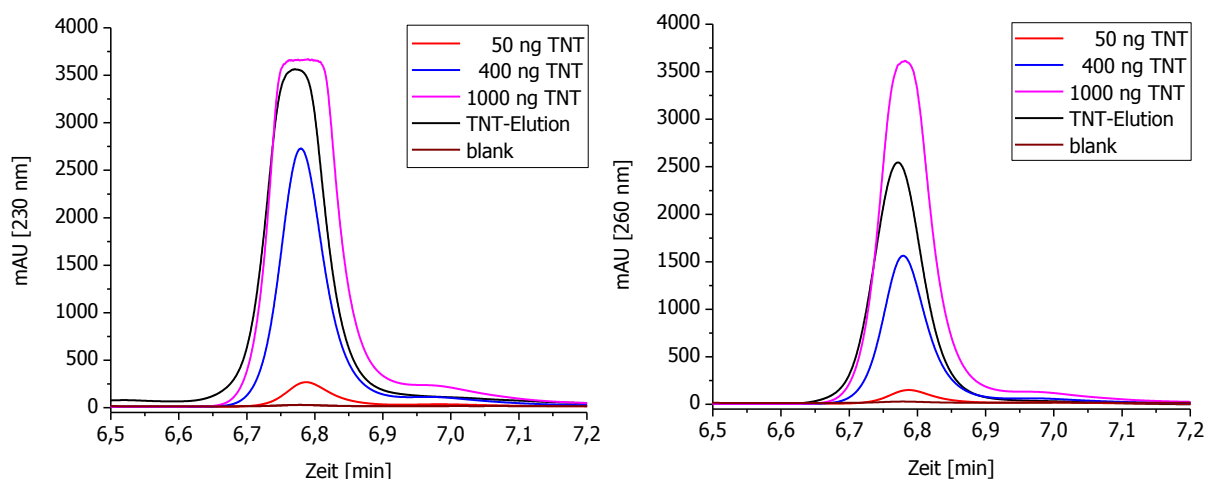


Abbildung 10.26: TNT-Peaks (links: 230 nm, rechts: 260 nm) der Chromatogramme der analytischen Säule nach der thermischen Elution der TNT-Affinitätssäule sowie von TNT-Vergleichsproben.

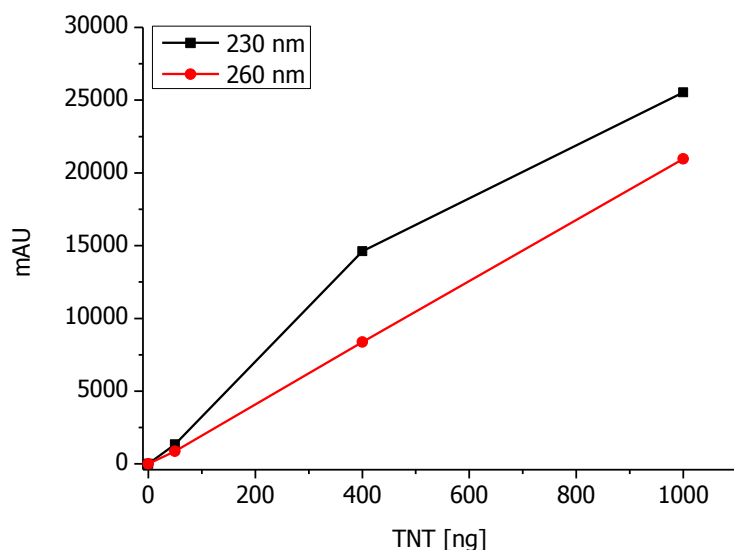


Abbildung 10.27: Auftragung der eluierten TNT-Menge versus Peakfläche der TNT-Peaks.

TNT wird bei dieser Online-Methode qualitativ über die Retentionszeit, quantitativ über die Peakfläche nachgewiesen. Um TNT mit einer weiteren analytischen Methode nachzuweisen, wurde zusätzlich ein TNT-ELISA durchgeführt. Dafür wurden drei Fraktionen, die Peak-Fraktion sowie Fraktionen vor und nach dem Peak, gesammelt. Mit diesem empfindlichen, spezifischen Test konnte TNT lediglich in der Peak-Fraktion nachgewiesen werden.

### 10.3.3 Vergleich der TNT-Affinitätssäulen, hergestellt aus den Seren K1B9 bzw. K2B12

Die Menge an polyklonalen Antikörper ist stets begrenzt. Da der Verbrauch linear mit der Kapazität der TNT-Säule ansteigt und die Kapazität der TNT-Affinitätssäulen nicht so hoch sein muss, wie die der zuletzt verwendeten TNT-Säule (64,8  $\mu\text{L}$ , Abb. 10.25), werden im Folgendem nur noch die kleineren TNT-Affinitätssäule mit einem Viertel des Volumens hergestellt (16,2  $\mu\text{L}$  statt 64,8  $\mu\text{L}$ ).

Um die beiden Seren K1B9 und K2B12 zu vergleichen, wurden TNT-Affinitätssäulen der beiden Seren unter gleichen Bedingungen angefertigt. Von jedem Serum wurden zweimal je 500  $\mu\text{L}$  auf die Hapten-Affinitätssäule injiziert, diese gewaschen und anschließend selektiv die anti-TNT-IgGs eluiert (Abb. 10.28).

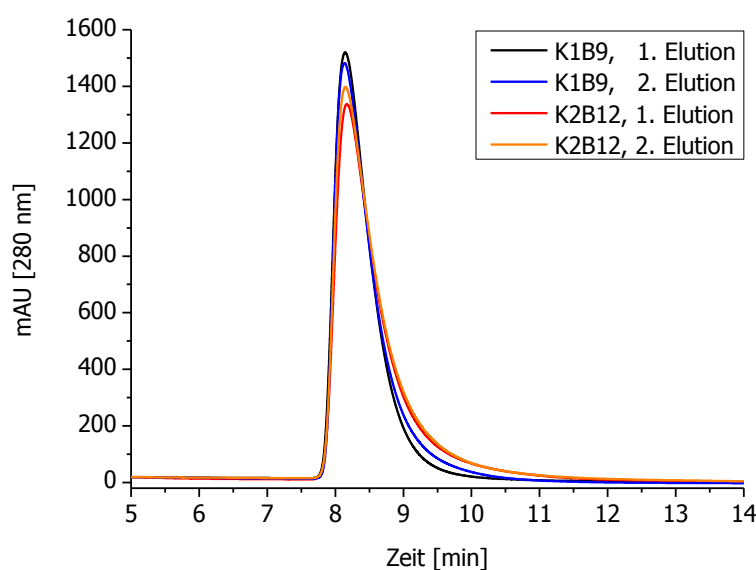


Abbildung 10.28: Anti-TNT-IgG-Elutionsprofile der Seren K1B9 und K2B12 (jeweils 2 Elutionen) bei Verwendung der großen Dinitrophenyl-Affinitätssäule (Kap. 9).

Die anti-TNT-IgG-Elution der Serumproben von K1B9 erzeugte etwas höhere IgG-Peaks mit weniger Tailing als die entsprechenden Signale bei Verwendung von K2B12. Das gesammelte Volumen der anti-TNT-IgG-Fractionen war bei den K2B12-Proben höher (K1B9: 2420  $\mu\text{L}$ , K2B12: 3090  $\mu\text{L}$ ) und auch die Peakflächen waren um ca. 8% höher als die entsprechenden Flächen der K1B9-Proben (Tab. 10.7). Die Elutionen 1 und 2 der hapten gereinigten Fractionen der Seren K1B9 bzw. K2B12 wurden vereinigt. Diese beiden anti-TNT-IgG-Lösungen der Seren K1B9 und K2B12 wurden anschließend mittels Zentrifugalfilter jeweils auf 70  $\mu\text{L}$  aufkonzentriert. Die IgG-Konzentration wurde spektroskopisch mit der 280 nm-Methode bestimmt (Verdünnung 1:50) und betrug  $50 \cdot 0,232 \text{ mg/mL} = 11,6 \text{ mg/mL}$  für K1B9, d. h. insgesamt wurden 0,812 mg spezifisches anti-TNT-IgG aus 1 mL Serum gewonnen. Die anti-TNT-IgG-Konzentration der K2B12-Fraktion betrug  $50 \cdot 0,248 \text{ mg/mL} = 12,4 \text{ mg/mL} \pm 0,868 \text{ mg}$  spezifisches anti-TNT-IgG aus 1 mL Serum, d. h. ca. 7% mehr als bei der entsprechenden anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Fraktion (Tab. 10.4).

Tabelle 10.4: Elutionsvolumen und anti-TNT-IgG-Menge der Haptenreinigung von K1B9 und K2B12.

Seren	Elutionsvolumen anti-TNT-IgG [ $\mu\text{L}$ ]	Peakfläche	anti-TNT-IgG [mg/mL] nach Einengen auf 70 $\mu\text{L}$	anti-TNT-IgG [mg]	Anteil anti-TNT-IgG [%] an Gesamt-IgG
K1B9	2420	61063	11,6	0,812	19
K2B12	3090	66190	12,4	0,868	12

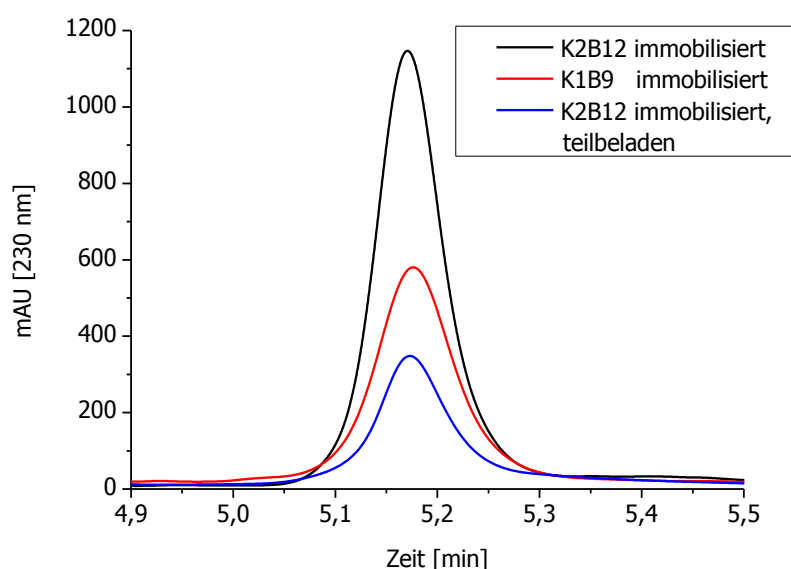
Die spezifischen anti-TNT-IgG-Fractionen von je 1 mL Serum wurden mittels Bis-NHS-Ester-Methode auf je 25 mg Trisopor™ immobilisiert. Somit konnten mit beiden Affinitätsmaterialien mehrere Säulen (16,2 µL) gefüllt werden.

Um die Kapazität der TNT-Affinitätssäulen (basierend auf anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub> bzw. anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>) zu bestimmen, wurden die Säulen mit TNT (mittels Spritzenpumpe) überladen, gewaschen und thermisch online eluiert. Bei Verwendung des K2B12-Affinitätsmaterials wurde 110 ng TNT eluiert. Dies entspricht einer TNT-Kapazität von 6,8 mg bzw. 29,9 µmol pro L Säulenvolumen. Das K1B9-Affinitätsmaterial konnte maximal 73 ng TNT an der Säule binden, somit ist die Kapazität nur 4,5 mg bzw. 19,8 µmol pro L Säulenvolumen (Tab. 10.5). Die TNT-Kapazität der anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>-Säule ist um 51% höher als die der entsprechenden anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Säule.

*Tabelle 10.5: Menge an anti-TNT-IgG nach der Haptenreinigung von K1B9 und K2B12 und Kennwerte der daraus hergestellten TNT-Affinitätssäulen (16,2 µL).*

Seren	anti-TNT-IgG [mg]	Elution TNT [ng]	TNT-Kapazität [mg] pro L Säulenvolumen	Kapazität [µmol] pro L Säulenvolumen
K1B9	0,812	73	4,51	19,8
K2B12	0,868	110	6,79	29,9

Bei einer Teilbeladung einer TNT-Affinitätssäule (anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> basiert) mit nur 37,5 ng TNT (15 min beladen mit einer 100 µg/L TNT-Lösung in PBS, Flussgeschwindigkeit: 25 µL/min) ergibt sich ein Elutionspeak, der 30 ng TNT entspricht (Abb. 10.29). Die Wiederfindung beträgt 80%.



*Abbildung 10.29: TNT-Peaks der Chromatogramme der analytischen Säule nach den thermischen Elutionen der TNT-Affinitätssäulen, hergestellt aus anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub> und anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> (komplett bzw. teilbeladen).*

Die Haptenreinigung wurde ausgehend von der recht hohen Kreuzreaktivität von K2B12 entwickelt. Das Serum K1B9 weist eine schwächere Kreuzreaktivität auf, daher waren höhere Verluste bei der Haptenreinigung von K1B9 zu erwarten, da einige anti-TNT-Antikörper nicht am Hapten binden würden. Das Verhältnis der Peakflächen der Elutionen bei der Haptenreinigung der Seren K1B9 und K2B12 entspricht dem Verhältnis der gewonnenen anti-TNT-IgG-Mengen nach der Aufkonzentrierung, sodass die Menge an spezifischen anti-TNT-Antikörpern bei den Seren K1B9 und K2B12 in

etwa gleich groß ist (Differenz: nur 7-8%). Dass die Kapazität der TNT-Säule, hergestellt aus anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>, um 51% höher ist, als bei Verwendung von anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub> lässt auf einen Fehler beim Immobilisierungsprozess des K1B9-Affinitätsmaterials schließen.

Die Kapazität der Säulen kann bei Verwendung höherer IgG-Mengen gesteigert werden (Kap. 10.2.2), was auch mit der vorgestellten TNT-Säule (Kap. 10.3.2, Abb. 10.25) bestätigt werden konnte. Diese wurde mit 45 µg anti-TNT-IgG pro mg Trisopor<sup>TM</sup> hergestellt (0,90 mg anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> auf 20 mg Trisopor<sup>TM</sup>) und führte zu einer Kapazität von 44,2 µmol pro L Säulenvolumen. Die in diesem Kapitel präsentierte Säule, hergestellt mit 35 µg IgG pro mg Trisopor<sup>TM</sup> (0,87 mg anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> auf 25 mg Trisopor<sup>TM</sup>), weist lediglich eine Kapazität von 29,9 µmol pro L Säulenvolumen auf. Der Kapazitätssteigerung um 45% steht eine Steigerung der IgG-Menge um nur 29% gegenüber. Diese Nichtlinearität kann auf Fehler bei den Kapazitätsbestimmungen zurückzuführen sein, da auch die Wiederfindung der TNT-Probe bei der Teilbeladung nicht vollständig war.

Da TNT-Affinitätssäulen kommerziell nicht angeboten werden, werden die Kapazitäten der TNT-Affinitätssäulen mit Kapazitäten von Affinitätssäulen für kleine Moleküle verglichen. Die Säulenkapazität der kleinen 16,2 µL-Säulen liegt im Bereich der kommerziell erhältlichen Affinitätssäulen für kleine Moleküle, die meist Säulenkapazitäten von 50-200 ng aufweisen (Tab. 10.6).

*Tabelle 10.6: Repräsentative Kapazitäten von Affinitätsmaterialien für kleine Moleküle.*

Affinitätsmaterial	Analyt	Trägerbasis	Kapazität [ng] pro Säule	molare Kapazität [µmol] pro L Säulenvolumen	Literatur
Venture <sup>®</sup> OF, HPLC	Ochratoxin A	SiO <sub>2</sub>	≥ 100	≥ 1,43	[273]
Venture <sup>®</sup> B12, HPLC	Vitamin B12	SiO <sub>2</sub>	≥ 50	≥ 0,21	[273]
Venture <sup>®</sup> BPA, HPLC	Bisphenol A	SiO <sub>2</sub>	≥ 100	≥ 2,53	[273]
Venture <sup>®</sup> TT, HPLC	Testosteron	SiO <sub>2</sub>	≥ 100	≥ 2,00	[273]
Venture <sup>®</sup> .AF, HPLC	Aflatoxin	SiO <sub>2</sub>	≥ 100	≥ 1,85	[273]
AflaCLEAN <sup>TM</sup>	Aflatoxin	Softgel	150	1,91	[274]
OtaCLEAN <sup>TM</sup>	Ochratoxin A	Softgel	200	1,97	[275]
Easi-Extract <sup>®</sup> Vitamin B12	Vitamin B12	Sephadex	1000	2,94	[276]
RIDA <sup>®</sup> Aflatoxin	Aflatoxin	Sephadex	40	1,52	[277]
RIDA <sup>®</sup> Ochratoxin A	Ochratoxin A	Sephadex	200	5,89	[278]
Ochraprep <sup>®</sup> P14	Ochratoxin	Sepdadex	1000	9,87	[279]
TNT-Säule 1 aus K1B9	TNT	Trisopor <sup>TM</sup>	73	19,8	
TNT-Säule 2 aus K2B12	TNT	Trisopor <sup>TM</sup>	110	29,9	
TNT-Säule aus Abb. 10.25	TNT	Trisopor <sup>TM</sup>	≥ 650	≥ 44,2	

Um die Ligandendichte der Affinitätsmaterialien, die unterschiedliche Analyten binden, vergleichen zu können, wurde die molare Kapazität der Trägermaterialien berechnet und verglichen (Tab. 10.6). Alle kommerziellen Säulen haben größere Volumina (Tab. 10.6: Venture<sup>®</sup> 173 µL, CLEAN<sup>TM</sup> 250 µL, RIDA<sup>®</sup> 85 µL) als die in dieser Arbeit hergestellten Affinitätssäulen, sodass die molaren Kapazitäten pro Volumen bzw. die IgG-Ligandendichten der TNT-Affinitätssäulen deutlich größer sind.

Das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur Herstellung einer HPLC-tauglichen polyklonalen TNT-Affinitätssäule wurde erfolgreich umgesetzt. Die IgG-Ligandendichten lassen sich auch mit den Kapazitäten von Protein-A-Säulen vergleichen (Tab. 10.7), da an diesen Säulen das voluminöse IgG gebunden wird.

*Tabelle 10.7: Repräsentative Kapazitäten von Protein-A-Affinitätsmaterialien [271, 280-282].*

Affinitätsmaterial	IgG-Kapazität [mg] pro mL Säulenvolumen	molare IgG-Kapazität [ $\mu\text{mol}$ ] pro L Säulenvolumen
Protein A-Sepharose™ CL-4B	20	13,9
Trisopor™-Protein A	25-40	17,4-27,8
Toyopearl® AF-RPROTEIN A HC-650F	50-65	34,7-45,1
MERCK ProSep® -vA Ultra media	20-35	13,9

Kommerziell erhältliche Protein-A-Affinitätssäulen weisen je nach Trägermaterial IgG-Kapazitäten zwischen 13,9 und 45,1  $\mu\text{mol}$  pro L Säulenvolumen auf, was mit den Ligandendichten der TNT-Affinitätssäulen vergleichbar ist. Die IgG-Moleküle binden an den kleineren Protein A. Somit wäre ebenfalls eine Abschätzung über eine Monolayerschicht der voluminöseren IgG-Moleküle denkbar. Da keine Oberflächenangaben der Trägermaterialien zur Verfügung stehen, ist die Berechnung der maximalen IgG-Kapazität jedoch nicht möglich. Die Ligandendichte der TNT-Affinitätssäule wird zusätzlich mit dem AAAA-Verfahren experimentell bestimmt (Kap. 10.4).

Eine weitere Erhöhung der Ligandendichte durch den Einsatz von höher konzentrierten Lösungen spezifischer Antikörper wäre denkbar, jedoch nicht notwendig, zumal die verfügbare Serummenge, bei Seren mit polyklonalen Antikörpern bereits durch das Herstellungsverfahren begrenzt ist. Da die Elutionen der TNT-Affinitätssäulen irreversibel sind und somit jede Säule nur einmalig genutzt werden kann, sollte aufgrund der begrenzten Menge der polyklonalen Antikörper, die TNT-Kapazität des Affinitätsmaterials der entsprechenden Anwendung angepasst werden. Um Batchmessungen zu ermöglichen, müsste eine Konstruktion für eine automatische Wiederbefüllung der Säule mit neuem Affinitätsmaterial nach erfolgter Messung realisiert werden.

Die bisherigen Arbeiten wurden mit gespikten Reinstwasserproben durchgeführt. Vor der Anwendung in der Umweltanalytik, sollten gespikte Proben mit komplexer Matrix, z. B. Wasser aus unbelasteten Gewässern getestet werden, um sicherzustellen, dass keine Störeffekte auftreten. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Herstellung und Elution der TNT-Affinitätssäule. Die Beladungsmethode wurde nicht systematisch variiert, d. h. dass die Flussgeschwindigkeit hierfür noch zu optimieren wäre. Auch wäre eine Änderung des Säulendurchmessers in diesem Zusammenhang zu prüfen.

Die hier vorgestellte thermische Online-Elution eröffnet einen Weg, Affinitätschromatographieanwendungen durchzuführen, die klassischerweise aufgrund zu hoher Bindungskonstanten ( $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) zwischen Ligand und Rezeptor erschwert sind. Eine spezifische IgG-Isolierung aus Antiseren mit hohen Affinitätskonstanten kann mit Affinitätssäulen erreicht werden, die mit einem gegenüber der Immunisierung abgewandelten Hapten gekoppelt werden, welche eine schwächere Ligand-Rezeptor-Bindung ausbilden. Mit Kreuzreaktionstests kann zu diesem Zweck ein geeignetes Molekül aus verschiedenen strukturverwandten Substanzen ausgewählt werden.

## 10.4 Bestimmung der Ligandendichte der TNT-Affinitätssäulen

Die Ligandendichte, d.h. die Menge der immobilisierten anti-TNT-Antikörper, wurde mit dem AAAA-Verfahren (Kap. 8.3.6) mit vorgeschalteter kompletter Hydrolyse des Trägermaterials bestimmt.

Um die Effizienz der beiden Immobilisierungsmethode (Glutaraldehyd-Methode und Bis-NHS-Methode) zu verifizieren, wurden Affinitätsmaterialien analysiert, die mit der gleichen Menge an anti-TNT-IgG immobilisiert wurden, einmal mittels Glutaraldehyd-Methode, einmal mittels der Bis-NHS-Methode (Abb. 10.30).

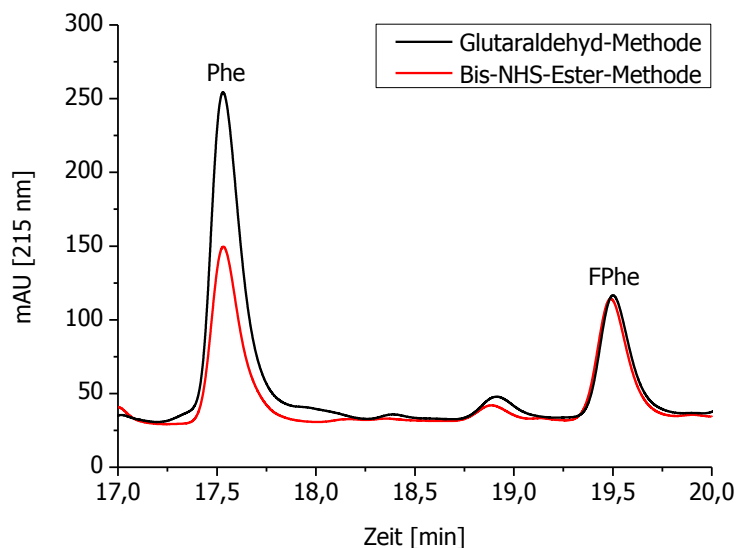


Abbildung 10.30: Ausschnitte der Chromatogramme der Hydrolysate von Trisopor™ 1500, immobilisiert mit anti-TNT-Antikörpern mittels Glutaraldehyd- bzw. Bis-NHS-Ester-Verfahren.

Da die Aminosäuresequenz von polyklonalen Antikörpern stets unterschiedlich ist, wird unter der Annahme der Gleichverteilung der Aminosäuren folgende Näherung verwendet:

1. Jede der 20 Aminosäuren hat einen Anteil von 1:20.
2. Die durchschnittliche Masse der Aminosäuren (AS) beträgt 105 g/mol.

Somit ergibt sich eine gemittelte Aminosäureanzahl pro Protein von:

$$\text{Anzahl}(AS) = \frac{M(\text{Protein})}{20 \cdot M(AS)}$$

Für ein IgG-Molekül mit einer Masse von ca. 144000 g/mol, ergibt sich daher eine durchschnittliche Aminosäureanzahl von 68,6 pro IgG-Molekül und Aminosäure.

Die IgG-Ligandendichte kann somit näherungsweise folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Ligandendichte} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] = \frac{\varepsilon \cdot Fl \text{ che}(AS)}{Fl \text{ che}(HAS) \cdot 68,6} \cdot 0,025 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \cdot 144 \frac{\text{g}}{\text{mmol}} \cdot \frac{0,2 \text{ mL}}{\text{Einwaage}[\text{g}]}$$

mit:

$$\varepsilon = \frac{Fl \text{ che}(HAS_{\text{Standard}})}{Fl \text{ che}(AS_{\text{Standard}})}$$



Für die beiden Säulenmaterialien ergeben sich eine IgG-Ligandendichte von 0,83 mg pro mL Säulenvolumen (Schüttdichte = 0,29 g/mL) für die NHS-Kopplung bzw. 1,48 mg pro mL Säulenvolumen bei Verwendung der Glutaraldehyd-Methode (Abb. 10.30). Die Ligandendichte bei der Immobilisierung mittels Bis-NHS-Methode beträgt lediglich 56% im Vergleich zu der Affinitätssäule, die mit der Glutaraldehyd-Methode hergestellt wurde.

Der Vorteil der Bis-NHS-Ester-Methode ist – neben der sauberen Immobilisierung (keine Nebenreaktionen) –, dass die nicht gebundenen Antikörper für eine spätere Immobilisierung verwendet werden können, da die Kopplung unter nativen Bedingungen (PBS, pH 7,6) und ohne Verwendung von Reduktionsmittel an das Trägermaterial erfolgt. Deshalb kann die anti-TNT-IgG-Menge der nicht-gebundenen Antikörper bei der nächsten Immobilisierung weiterverwendet werden. So relativiert sich der Nachteil, dass die Bis-NHS-Ester-Methode niedrigere Ligandendichte erzeugt, da höhere anti-TNT-IgG-Mengen bei der Immobilisierung diesem Effekt entgegenwirken (Abb. 10.8).

Um die Ligandendichte der beiden zuletzt hergestellten Affinitätsmaterialien mittels AAAA zu bestimmen, wurden 2,59 mg des anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Affinitätsmaterials bzw. 2,53 mg des anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>-Affinitätsmaterials hydrolysiert. Die Chromatogramme (Abb. 10.31) bestätigen, dass mehr anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> auf dem porösen Glas immobilisiert wurde als bei der entsprechenden K1B9-Probe. Die Ligandendichte des anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub>-Affinitätsmaterials wurde mit 2,87 mg/mL, die des anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Materials mit 1,96 mg/mL bestimmt (Tab. 10.8).

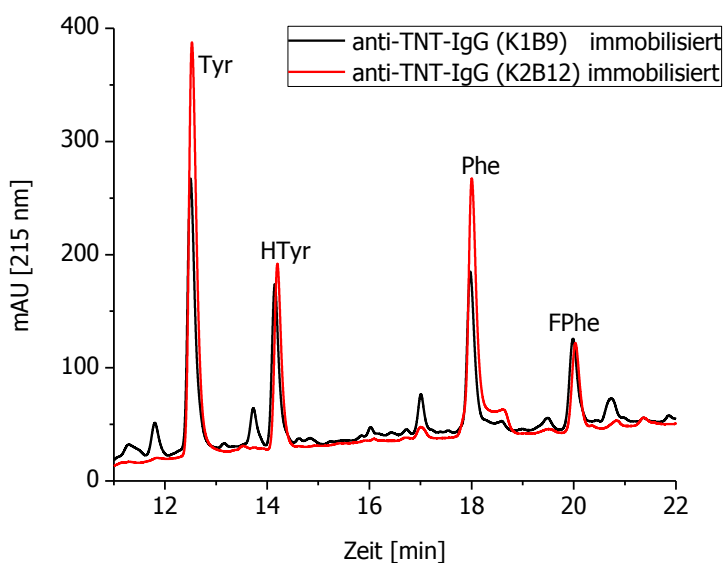


Abbildung 10.31: Chromatogramme der Hydrolysate der Trisopor™-Affinitätsmaterialien von anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub> und anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> bei Verwendung der haptengereinigten anti-TNT-IgG-Fractionen, welche aus gleichen Serenvolumina hergestellt wurden.

Die theoretische IgG-Ligandendichte einer 16,2 µL-Affinitätssäule, die 73 ng TNT eluiert (anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>-Säule), beträgt 1,43 mg pro mL Säulenvolumen, wenn jeder Antikörper zwei TNT-Moleküle binden würde, berechnet mit folgender Formel:

$$\text{Ligandendichte} = \frac{\text{TNT - Kapazität}}{\text{Säulenvolumen}} \cdot \frac{\text{Molmasse IgG}}{2 \cdot \text{Molmasse TNT}}$$

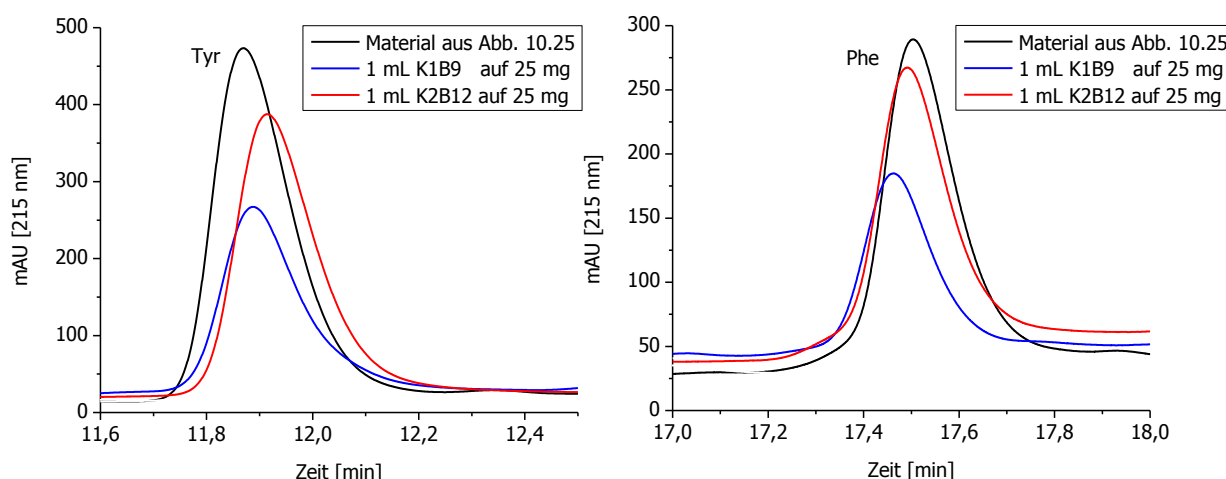
Die analoge Berechnung für die Elution von 110 ng TNT (K1B9) ergibt eine Ligandendichte von 2,15 mg IgG pro mL Säulenvolumen. Der Vergleich der über die TNT-Elutionen berechneten und

mittels des AAAA-Verfahrens gemessenen Ligandendichten macht deutlich, dass die experimentell mit AAAA ermittelten Ligandendichten um 33% (K2B12 basiert) bzw. 37% (K1B9 basiert) deutlich größer sind als die aus den Elutionen kalkulierten. D. h. bei der vollbeladenen TNT-Affinitätssäule würde nicht jeder anti-TNT-Antikörper zwei TNT-Moleküle binden.

Als drittes Affinitätsmaterial wurde das Material der großen TNT-Säule aus Abbildung 10.25 (64,8  $\mu$ L, K2B12 basiert) hydrolysiert. Dessen Ligandendichte wurde mit 4,77 mg pro mL Säulenvolumen berechnet. Die Tyr- und Phe-Peaks der Hydrolysate der drei untersuchten Affinitätssäulen sind in Abbildung 10.32 zu sehen, die Ligandendichten in Tabelle 10.8 aufgeführt.

*Tabelle 10.8: Ligandendichten (spezifisches anti-TNT-IgG) von verschiedenen TNT-Affinitätssäulen, Berechnung über TNT-Elution bzw. über AAAA des Affinitätsmaterials.*

	IgG-Ligandendichte [mg] (TNT-Elution) pro mL Säulenvolumen	IgG-Ligandendichte [mg] (AAAA) pro mL Säulenvolumen	Anteil am IgG-Monolayer[%] (AAAA)
K1B9	1,43	1,96	9,2
K2B12	2,15	2,87	13,4
Säule aus Abb. 10.25	3,13	4,77	22,2



*Abbildung 10.32: Tyr-Peaks (links) und Phe-Peaks (rechts) der Chromatogramme der Hydrolysate von drei verschiedenen Trisopor™-Affinitätsmaterialien (Proben: Säulenmaterial aus der Säule aus Abb. 10.25 sowie Affinitätsmaterial, hergestellt aus den haptengereinigten anti-TNT-IgG-Fractionen aus 1 mL Serum K1B9 bzw. K2B12, immobilisiert auf jeweils 25 mg Trisopor™).*

Die über die TNT-Elutionen berechneten Ligandendichten betragen 73% bzw. 75% der experimentell über das AAAA-Verfahren ermittelten. Etwa die Hälfte der anti-TNT-Antikörper binden also nicht, wie angenommen, zwei TNT-Moleküle. Mögliche Ursachen dafür könnten sein, dass Bindungsstellen der immobilisierten anti-TNT-IgG-Moleküle sterisch nicht zugänglich waren oder dass die spezifischen anti-TNT-IgG-Fractionen mit anderen Proteinen verunreinigt waren. Die theoretisch berechnete monomolekulare IgG-Belegung von 21,4 mg pro mL Trägermaterial (Kap. 10.1) wird auch bei der höchsten experimentell ermittelten Ligandendichte (AAAA-Verfahren) nur zu 22% erreicht.

Das AAAA-Verfahren ist ein in dieser Arbeit neuentwickeltes Verfahren, um die gesamte Immobilisierungsdichte auf porösen Gläsern oder synthetischen Polymeren zu bestimmen. Hiermit kann die Effizienz der jeweiligen Immobilisierung überprüft werden. Diese analytische Frage ist besonders anspruchsvoll, da die meisten herkömmlichen Methoden unter diesen Bedingungen fehlschlagen. Der

Mangel an quantitativen und leicht durchführbaren Methoden kovalent gebundene Proteine auf festen Trägern und Oberflächen zu bestimmen, konnten mit diesem Verfahren überwunden werden, wobei der Einsatz nur einen geringen instrumentellen Aufwand benötigt. Um AAAA als Routinemethode für die Qualitätskontrolle (QC) von Proteinimmobilisierung zu etablieren, muss diese noch validiert werden. Bisher ist hierfür jedoch noch kein zertifiziertes Material erhältlich.



## 11 Zusammenfassung und Ausblick

Die Detektion von Sprengstoffen gewinnt durch die zunehmende Bedrohung durch Terroranschläge erheblich an Bedeutung. In diesem Zusammenhang kam immer häufiger Plastiksprengstoff zum Einsatz, der zu einem großen Teil aus PETN besteht, sodass ein schneller, zuverlässiger und selektiver Nachweis benötigt wird. Selbst Spürhunde können PETN aufgrund des niedrigen Dampfdrucks praktisch nicht detektieren, sodass Zusatzstoffe bei der kommerziellen Herstellung von Plastiksprengstoff zur späteren Detektion beigemischt werden. Um PETN direkt vor Ort unkompliziert nachzuweisen, fehlen selektive Methoden. Als hochselektive PETN-Analytik bieten sich immunochemische Methoden an, weshalb die Entwicklung von empfindlichen, hochselektiven anti-PETN-Antikörpern nötig ist. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Hapten für die Herstellung von anti-PETN-Antikörpern durch die Anwendung des Konzepts des bioisosteren Ersatzes synthetisiert. Dies ist eine Methode, die häufig im pharmazeutischen Bereich jedoch nicht bei der Entwicklung von Immunoassays eingesetzt wurde. Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem entsprechenden BSA-Konjugat führte zu polyklonalen Antikörpern, die eine ausgezeichnete Selektivität und Empfindlichkeit gegenüber PETN aufweisen. Die Werte der Kreuzreaktivitäten betragen deutlich unter 0,1% für alle getesteten Verbindungen, sodass diese bei allen praktischen Anwendungen vernachlässigt werden können. Die Nachweisgrenze des kompetitiven ELISAs liegt bei 0,15 µg/L und der Messbereich umfasst drei Zehnerpotenzen (1-1000 µg/L). Die Antikörper sind sowohl hinreichend pH-stabil als auch robust gegen Lösungsmittelzusätze. Die hier präsentierten Antikörper können für die Entwicklung von Immunoassays, Schnelltests, Biosensoren und anderen immunochemischen Tests zum analytischen Nachweis des Sprengstoffs PETN verwendet werden. Das bei der Antikörperherstellung erfolgreich eingesetzte Konzept des bioisosteren Ersatzes sollte somit künftig als vielversprechende Methode bei der Entwicklung von Antikörpern gegen kleine Moleküle systematisch angewendet werden.

In der Umwelt gelangt der Sprengstoff TNT immer noch durch Auswaschungen von alten TNT-Beständen ins Grundwasser, sodass Altlasten durch die TNT-Verunreinigung des Wassers detektiert werden können. Für diese Analytik wurde eine HPLC-kompatible TNT-Affinitätssäule hergestellt, die TNT aus Wasserproben isoliert und an der Säule anreichert. Poröses Glas wurde als optimales Trägermaterial identifiziert, da es zum einen TNT nicht unspezifisch bindet – im Gegensatz zu den synthetischen Polymeren – zum anderen eine schnelle Kinetik aufweist – im Gegensatz zu den kohlenhydratbasierten Gelen. Ein weiterer Vorteil dieses Materials ist die hohe Druckbeständigkeit, die für den Einsatz an der HPLC erforderlich ist. Das in dieser Arbeit verwendete Trägermaterial Trisopor™ ist jedoch nicht mehr kommerziell verfügbar. Allgemein ist das Angebot von Beads aus porösem Glas trotz ihrer nachweisbar guten Eigenschaften limitiert. Die Gläser haben sehr definierte Porendurchmesser, deren Größe durch den Herstellungsprozess variiert werden kann. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Trägermaterialien hohen Herstellungskosten konnten sie sich jedoch bisher nicht am Markt durchsetzen. Poröse Gläser sind druckstabil und ermöglichen eine schnelle Kinetik, sodass sie hervorragend für die Anwendung in der HPLC geeignet sind.

Um Immobilisierungsdichten zu bestimmen und Immobilisierungsmethoden zu optimieren, wurden orangefarbene Dabsyl-Proteine synthetisiert und immobilisiert. Die Färbung erwies sich als Indikator für die Immobilisierungsdichte. Dieses Verfahren kann nur zur Bestimmung der Immobilisierungsdichte der Kopplungen von Farbstoff-Proteinen mit dem Trägermaterial genutzt werden. Zur Bestimmung der Immobilisierungsdichten der im Rahmen dieser Arbeit produzierten Affinitätssäulen wurde ein neues vereinfachtes, derivatisierungsfreies Verfahren zur Aminosäurebestimmung entwickelt, da die üblichen spektroskopischen Proteinbestimmungsmethoden

aufgrund der hohen Wechselwirkung mit dem Trägermaterial zur quantitativen Proteinbestimmung auf Feststoffen ungeeignet sind. Dieser Methode wird zur Proteinbestimmung eine Hydrolyse der Proteinlösung bzw. des Affinitätsmaterials vorgeschaltet. Die Aromatische Aminosäureanalyse (AAAA) basiert auf der Bestimmung von Tyr und Phe unter Verwendung eines Standard-HPLC-Systems. Zur Quantifizierung dienen zwei interne Standardverbindungen, Homotyrosin (HTyr) und 4-Fluorphenylalanin (FPhe). Die Nachweisgrenzen (LOD) liegen sowohl für Tyr als auch für Phe bei  $0,05\ \mu\text{M}$  ( $\sim 10\ \mu\text{g/L}$ ) bei einer Detektion bei 215 nm. Die LOD für eine Proteinbestimmung ist mit  $16\ \text{mg/L}$  ( $\sim 300\ \text{ng BSA}$ ) mit spektroskopischen und kolorimetrischen Verfahren vergleichbar. Die AAAA einschließlich der Hydrolysestufe bietet eine hervorragende Präzision ( $s = 5\%$ ). Die Methode wurde mit zertifizierten Referenzmaterialien (Certified Reference Material, CRM) mit Aminosäuren (ohne Hydrolyse) und mit reinem Rinderserumalbumin (mit Hydrolyse) validiert. Die nach Standardprotokoll 22-stündige Hydrolyse der Proteine und Peptide konnte durch Einsatz von Mikrowellentechnik auf nur 30 Minuten verkürzt werden. Die chromatographische Bestimmung aromatischer Aminosäuren in Verbindung mit der schnellen Mikrowellenhydrolyse ist somit ein guter Kompromiss zwischen Zeit- und Arbeitsaufwand auf der einen und analytischer Präzision auf der anderen Seite. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung der Ligandendichte konnte erfolgreich bei den hergestellten TNT-Affinitätssäulen eingesetzt werden, um die Antikörperdichte zu bestimmen.

Um die Antikörper für die Herstellung von Affinitätssäulen aus den TNT-Seren abzutrennen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren getestet. Zunächst wurde die klassische Protein-A-Affinitätschromatographie genutzt, die nahezu die gesamten Antikörper aus den Seren isoliert. Später wurde die Trennung an einer Dinitrophenyl-Affinitätssäule durchgeführt, um nur die spezifischen anti-TNT-IgG aus den Seren K1B9 und K2B12 zu isolieren. Durch das zweite Verfahren erhöhten sich die TNT-Kapazitäten der Affinitätssäulen um das 20 bis 100-fache.

Aufgrund der hohen Affinitätskonstanten der polyklonalen anti-TNT-Antikörper ( $5,1 \cdot 10^9\ \text{L/mol}$  für K1B9 bzw.  $2,3 \cdot 10^9\ \text{L/mol}$  für K2B12L) lässt sich TNT nicht durch eine typische saure Elution der TNT-Affinitätssäule vollständig eluieren. Daher wurde eine alternative, neuartige Methode, die irreversible, denaturierende, thermische Online-Elution entwickelt. Um dieses Prinzip durchführen zu können, wurde eine spezielle Säulenheizung entworfen. Die TNT-Quantifizierung erfolgt mittels UV-Absorption. Der Messbereich bei 230 nm liegt bei 5 bis 500 ng TNT, bei 260 nm wurde die Linearität der Kalibrierungskurve bis 1000 ng TNT überprüft. Die maximale Kapazität einer im Rahmen dieser Arbeit hergestellten TNT-Affinitätssäule betrug 650 ng TNT ( $10\ \mu\text{g TNT pro mL Säulenvolumen}$ ). Da die Elutionen der Affinitätssäulen irreversibel sind und somit jede Säule nur einmalig genutzt werden kann, sollte aufgrund der begrenzten Menge der polyklonalen Antikörper die TNT-Kapazität des Affinitätsmaterials den entsprechenden Anforderungen angepasst werden.

Während in dieser Arbeit die erfolgreiche Herstellung der TNT-Affinitätssäulen und die Entwicklung einer Online-HPLC-Methode für deren Elution im Vordergrund stand, sollte in weiterführenden Arbeiten noch die Flussgeschwindigkeit für die Beladung optimiert werden. Insbesondere wäre in diesem Zusammenhang interessant, unter Erhalt des Volumens die Säule zu verkürzen und den Durchmesser zu vergrößern. Vor der TNT-Bestimmung von Realproben wären noch Untersuchungen an unbelasteten und gespickten Realwasserproben von Interesse, um Störeffekte durch deren komplexe Matrix auszuschließen. Ein besserer Durchsatz bei der Online-Methode ließe sich durch eine Konstruktion erzielen, die es ermöglicht, das verbrauchte Affinitätsmaterial nach der Elution automatisch aus der Säule zu entfernen und durch frisches zu ersetzen.

Das gesetzte Ziel, ein Herstellungsverfahren sowie eine Online-Methode für eine polyklonale TNT-Affinitätssäule zu entwickeln, wurde mit den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden erreicht. Die verfolgten Strategien sind keineswegs nur auf diese konkrete Anwendung beschränkt. So ist eine Aufreinigung von Seren mit polyklonalen Antikörpern mit starker Antigen-Antikörper-Bindung durch eine leichte Strukturabwandlung des Antigens eine vielversprechende Alternative zur klassischen unselektiveren Protein-A-Reinigung. Mit Kreuzreaktionstests kann zu diesem Zweck ein geeignetes Molekül aus verschiedenen strukturverwandten Substanzen ausgewählt werden. Durch die entwickelte Online-Methode können nun auch solche Rezeptor-Ligand-Bindungen mit hohen Bindungskonstanten ( $K_A > 10^8 \text{ M}^{-1}$ ), die einer reversiblen Elution nicht zugänglich sind, für die Affinitätschromatographie verwendet werden. Somit wird das Anwendungsspektrum der Affinitätschromatographie deutlich erweitert.





# Anhang

## A1 Chemikalien

### Chemikalie (Reinheit)

Aceton, HPLC Grade (99%)  
Acetonitril, LC/MS grade (> 99,9%)  
Acetonitril, LC-MS grade (99,95%)  
Ammoniumnitrat, ACS reagent (≥ 98%)  
L-Aminosäuren, analytical standard  
L-Aminosäurestandard, analytical standard (0,25 mM)  
L-Aminosäurestandard, NIST in 0,1M HCl  
anti-rabbit-IgG (H&L), R1364P  
Bernsteinsäureanhydrid (≥ 99,5%)  
BCA Protein Assay  
Bis-NHS-Diglykolsäure  
Bovines Serumalbumin, lyophilized powder, essentially fatty acid free, (agarose gel electrophoresis), 1x Crystallized (≥ 97%)  
Bovines Serumalbumin, heat shock fraction, pH 7, (≥ 98%)  
1,1'-Carbonyldiimidazol, zur Synthese (≥ 97%)  
Cellufine™ Formyl  
α-Cyan-4-hydroxymethylsäure, Matrix für MALDI/MS  
Dabsylchlorid, (≥ 97%) AT  
1,5-Diaminopentandihydrochlorid, 1 M  
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (99%)  
1,4-Dioxan (99,8%), wasserfrei  
1,3-Dinitrobenzol (99%)  
  
2,4-Dinitrophenyllessigsäure (95%)  
Di-(N-Succinimidyl)carbonat (≥ 99,5%)  
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid, BioXtra  
Ethanolamin (≥ 99%)  
Ethylendiamin (≥ 99,5%)  
4-Fluor-DL-Phenylalanin  
Fractogel® EMD Epoxy  
Glycin (≥ 99,5%)  
Guardian™ (Peroxidase-Konjugat-Stabilisierungs- und Verdünnungslösung)  
Glutaraldehydlösung (50%ig)  
Glycerin 99%, Molecular Biology Tested  
Hepcidin-25, LEAP-1  
Hexogen  
DL-Homophenylalanin  
L-Homotyrosin-Hydrobromid

### Firma

Sigma-Aldrich, Steinheim, 650501  
Fisher Chemical, 10799704  
Carl Roth, Karlsruhe, AE70.2  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 221244  
Fluka (Sigma-Aldrich), LAA21-1KT  
Sigma-Aldrich, AAS18  
NIST, SRM 2389a  
Acris Antibodies, Herfurt, R1364P  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 239690  
Pierce Thermo scientific, 23227  
Aber GmbH, Karlsruhe, AB 262000  
Sigma-Aldrich, Steinheim, A7511-5g  
  
Sigma-Aldrich, Steinheim, A7906-10 g  
  
Merck, Darmstadt, 802301.0005  
Amsbio, 676944324  
Bruker, 201344  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 39068  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 08730  
Sigma-Aldrich, Steinheim 80002  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 296309  
Dr. Ehrenhofer GmbH, Augsburg, C127831  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 209562  
Sigma-Aldrich, Steinheim, 225827  
Sigma-Aldrich, Steinheim, E1769-1G  
  
Fluka (Sigma-Aldrich), 02400  
Fluka (Sigma-Aldrich), 03550  
Sigma-Aldrich, Steinheim, F5251  
Merck Millipore, 1169610100  
AppliChem, Darmstadt, A3707  
Thermo Scientific, 37548  
  
Sigma-Aldrich, Steinheim, G7651  
Sigma-Aldrich, Steinheim, G5516  
Peptanova, No. 4392-s  
BAM, Abteilung 2  
Iris Biotech, Marktredwitz, HAA6720  
Iris Biotech, Marktredwitz, HAA6750

Huminsäure Natriumsalz (45-65%)	Carl Roth, Karlsruhe, 7824.1
Kaliumhydroxidlösung, für HPLC (~ 45%)	Fluka (Sigma-Aldrich), 03564
Kaliumphosphat dibasisch (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 60353
Kaliumphosphat monobasisch, BioUltra (≥ 99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 60218
Kaliumphosphat monobasisch, für HPLC (≥ 99,5%)	Fluka (Sigma-Aldrich), 60221
Kaliumsorbat (≥ 99,0%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 85520
Magermilchpulver	Saliter, DE BY 7144 EG
Methanol, LC/MS grade	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, 10031094
NanoOrange <sup>®</sup> Proteinquantifizierungskit	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Natriumchlorid, BioUltra (99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 71376
Natriumchlorid, für HPLC (≥ 99,5%)	Fluka (Sigma-Aldrich), 73575
Natriumcitrat monobasisch, BioXtra (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 71497
Natriumcyanoborhydrid (95%)	Acros organics, New Jersey, USA
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 71500
Natriumdihydrogenphosphat, HPLC-grade	Sigma-Aldrich, Steinheim, 71633
Natriumhydroxid (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 30620
Natriumperiodat (≥ 98,8%)	Applichem, A1886
Natriumdihydrogenphosphat, dibasisch Dihydrat, Bioultra (≥ 99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 71643
N-Hydroxysuccinimid (98%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 130672
NHS-aktivierte Agarose	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, 26196
Nitrobenzol	Promochem GmbH NIT 1, Wesel
Nitroglycerin, Nitrolingual infus. (1mg/mL)	Pohl Boskamp, Hohenlockstedt, PZN-7242812
2-Nitrophenylelessigsäure (98%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 103608
3-Nitrophenylelessigsäure (99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, N20204
4-Nitrophenylelessigsäure (99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, N20506
4-(4-Nitrophenyl)buttersäure (98%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 55472
<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid (99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 80002
<i>N, N'</i> -Dimethylacetamid (≥ 99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 38840
<i>N</i> -Succinimidyl <i>N</i> -(2,4-dinitrophenyl)-6-aminocaproate (≥ 95%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 55472
Oktogen	BAM, Abteilung 2
Pentaerythrit, Pentaerythritol (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 236241
Pepsin aus der Schweinedarmmukosa (≥ 400 units/mg protein)	Sigma-Aldrich, Steinheim, P7125
Phenol, BioXtra (≥ 99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, P5566
Phosphorsäure, für HPLC (85-90%)	Fluka (Sigma-Aldrich), 79606
2-Propanol (Isopropanol), CHROMASOLV Plus für HPLC (99,9%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 650447
Salzsäure (0,1 M)	Fluka (Sigma-Aldrich), 318965
Salzsäure, sequencing grade (6 M)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, 24308
Schwefelsäure (95 - 97%)	AppliChem, Darmstadt, A0655
Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Life Science, 17-0149-01
Serum vom Menschen	Sigma-Aldrich, Steinheim, H4522
Serum vom Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim, R9133
Sinapinsäure (98%)	Acros Organics, 115550010

TentaGel <sup>®</sup> M NH <sub>2</sub>	Rapp Polymere, M30352
Tetrabutylammonium-borhydrid (98%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 230170
5,5'-Tetramethylbenzidin, research grade	SERVA, Heidelberg, 35926.02
TN6PHA-NHS-Ester	synthetisiert von S. Ramin
Triacetontriperoxid (0,1 mg/mL)	AccuStandard M-8330-ADD-24
Triethylamin, BioUltra (≥ 99,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 90335
Trifluoressigsäure, LC-MS Ultra (≥ 99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, 14264
2,4,6-Trinitroanilin (99%)	SelectLab Chemicals, Ex188
1,3,5-Trinitrobenzol	Promochem GmbH, NIT 30, Wesel
2,4,6-Trinitrophenol	Promochem GmbH, NIT 19, Wesel
2,4,6-Trinitrotoluol	Promochem GmbH, NIT 29, Wesel
Trisopor <sup>™</sup> -Amino 1500	VitraBio GmbH, Steinach
Trisopor <sup>™</sup> -Amino 3000	VitraBio GmbH, Steinach
Trisopor <sup>™</sup> -Diol 3000	VitraBio GmbH, Steinach
Trisopor <sup>™</sup> , nativ 1500	VitraBio GmbH, Steinach
2,4,6-Trinitrotoluollösung (5 g/L TNT in Methanol)	synthetisiert und bereitgestellt von S. Ramin
Toyopearl <sup>®</sup> AF-Formyl-650	Tosoh Bioscience AF, 08004
Toyopearl <sup>®</sup> AF-Tresyl-650	Tosoh Bioscience AF, 14471
Tween <sup>®</sup> 20, BioXtra	Sigma-Aldrich, Steinheim, P7949
Tween <sup>®</sup> 20, für ELISA	SERVA, Heidelberg, 37470.01
UltraLink <sup>™</sup> Biosupport	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, 53110
Wasserstoffperoxidlösung (≥ 30%)	Fluka (Sigma-Aldrich), 95321

## Hyperimmunseren

Serum	Firma (Durchführung der Hyperimmunisierung)	Immunogen	Verwendete Seren
Kaninchenserum mit anti-TNT-Antikörper	Eurogentec, Seraing, Belgien	6-TNPHA-BSA	Kaninchen 1, <i>Boost</i> 9 Kaninchen 2, <i>Boost</i> 12
Kaninchenserum mit anti-PETN-Antikörper	Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee, D	PETriN-CHA-BSA	alle Seren

## Tracer

6-TN6PHA-POD	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von S. Ramin
PETriN-CHA-POD	Synthetisiert, siehe Kapitel 5.6

## A2 Puffer und Lösungen

Die pH-Werte wurden, falls nicht anders angegeben, mit Natronlauge (20%) bzw. Salzsäure (20%) eingestellt. Die Puffer wurden bei 4°C gelagert und nicht länger als zwei Wochen verwendet. Die TMB-Lösung wurde frisch angesetzt.

Carbonatpuffer, pH 9,6	30 mM Natriumcarbonat
	70 mM Natriumhydrogencarbonat
Citratpuffer, pH 4,0	220 mmol/L $C_6H_7NaO_7$
Glycin-HCl-Lösung, pH 2,2	100 mM Glycin, eingestellt mit konz. HCl
MALDI-Matrix	115 L g esättigte $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in Acetonitril / 0,1%-ige Tetrafluoressigsäure (90/10)
	8 $\mu$ L 10%-ige Tetrafluoressigsäure, 8 $\mu$ L 100 mM Ammoniumdihydrogenphosphat
PBS, pH 7,6	10 mmol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$
	70 mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
	145 mmol/L NaCl
Substratlösung	21,6 mL Citratpuffer
	540 $\mu$ L TMB-Lösung
	8,34 $\mu$ L Wasserstoffperoxid
TMB-Lösung	8 mmol/L $C_{16}H_{40}BN$
	40 mmol/L $C_{16}H_{20}N_2$
	ad N,N'-Dimethylacetamid; unter Argon-Atmosphäre
Tris, pH 8,5	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	150 mM Natriumchlorid
Waschpuffer, pH 7,6	45 mmol/L $KH_2PO_4$
	375 mmol/L $K_2HPO_4$
	1,5 mmol/L $C_6H_7KO_2$
	3% Tween <sup>®</sup> 20

## A3 Verbrauchsmaterialien

Material, Bezeichnung	Firma
Anschlussstücke, F-120 (PEEK, für OD 1/16“)	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Blindstopfen, P-551 (PEEK, für 10-32-Gewinde)	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Einmalspritzen mit -kanülen:	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
- HSW NORM-JECT (2-teilig, 1 mL, 5 mL)	
- HSW FINE-JECT (0,80 x 40 mm, 1,60 x 40 mm)	
Einsätze, Micro Insert (200 $\mu$ L für 10 mm Kurzgewindeflasche)	WICOM Germany GmbH, Heppenheim
Fittinge NT Peek Headless 1/16	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Gewindegläschen mit Schraubkappen	WICOM Germany GmbH, Heppenheim
Gerade Verbinder mit Außengewinde aus Messing, Schläuche innen 4, außen 5 mm	RGT Reichelt Chemietechnik GmbH, Kat. Nr. 50172
Kurzgewindeflaschen, 10 mm (2 ml) mit Kappen (für 10 mm-Kurzgewinde)	

Butylgummi /Teflon-Septum)	
Gewindeflaschen, EPA	BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden
(20 mL, 24-400 Gewinde, 57 x 27,5 mm)	
Kappen (PP, für 24-400 Gewinde,	
Silikon/PTFE-Septum)	
Glasspritzen mit Kanülen,	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
710 RN 100 µL Spritze (22s/51/2)	
HiTrap™ NHS-activated HP	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala
HPLC-Leersäulen	
- Guard Column C128 20 mm x 1 mm ID	IDEX Health & Science LLC, Oak Harbor
- Guard Column C130B 20 mm x 2 mm ID	IDEX Health & Science LLC, Oak Harbor
- Leersäule 60 x 4 mm ID	CS Chromatographie Service GmbH, Art. Nr. 424004
<b>HPLC-Säulen:</b>	
- AdvanceBio Peptide Map C18, Coreshell	Agilent Technologies Deutschland GmbH
Länge: 150 mm, ID: 2,1 mm;	
Partikelgröße: 2,7 µm;	
Porengröße: 120 Å	
- Kinetex, XB-C18,	Phenomenex®, Inc., Aschaffenburg
Länge: 150 mm, ID: 3 mm;	
Partikelgröße: 2,6 µm;	
Porengröße: 100 Å	
- Onyx™ Monolithic C18	Phenomenex®, Inc., Aschaffenburg
Länge: 50 mm, ID: 2 mm;	
Porengröße: 130 Å	
- Aeris Peptide XB-C18;	Phenomenex®, Inc., Aschaffenburg
Länge: 250 mm, ID: 2,1 mm;	
Partikelgröße: 3,6 µm;	
- Onyx™ Monolithic C18 Semi-Prep	Phenomenex®, Inc., Aschaffenburg
Länge: 100 mm, ID: 10 mm	
<b>HPLC-Vorsäulen bzw. Filter:</b>	
- AdvanceBio Peptide Map Fast Guard	Agilent Technologies Deutschland GmbH
2,1 mm x 5 mm, Partikelgröße: 2,7 µm	
- SecurityGuard ULTRA Cartridges and	Phenomenex®, Inc., Aschaffenburg
Holder C18-Peptide for 2,1 mm ID	
- Hamilton PRP-C18, Länge 50 mm, ID 2,1	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
mm; Partikelgröße 5 µm	
- Inline-Solvent-Filter A-313	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
(Edelstahl, 20 µm, für 10-32-Gewinde)	
- Javelin Filter für 2,1 mm ID, Peek	Thermo Scientific, Bellefonte, USA
Kapillaren:	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
- 1532 (PEEK, ID 500 µm, OD 1/16")	
- U-155 (Edelstahl, ID 125 µm, OD 1/16")	
- U-104 (Edelstahl, ID 500 µm, OD 1/16")	
Kapillarschneider	
A-327 Standard Polymer Tubing Cutter (für	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
OD 1/16" und OD 1/8")	

Kappen	
P-754 (ETFE, für 10-32-Gewinde)	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Küvetten:	
UV-Küvette mikro (70 µL, z = 8,5)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Micro-Centrifugal Filter, 750 µL	Thermo Scientific, F25176
Mikrotiterplatten:	
- UV-Star® Microplates (96 Well, F-Boden (Kaminform), µClear)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Microlon 600 (96 Well, high binding, F-Boden (Kaminform), glasklar)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
NAb™ Protein A Plus Spin Kit, 0,2 mL	Thermo Scientific 89948
PD10 Columns	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
pH-Indikator	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
pH-Fix 0-14	
Universal-Indikator pH 1-14, Rolle	
Pipettenspitzen, epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, Safe-Lock Gefäß	Eppendorf AG, Hamburg
Schläuche:	
- FEP-Schlauch (ID 0,8 mm, OD 1/16'')	Bohlender GmbH, Grünsfeld
- PTFE-Schlauch (0,5; 1,6 mm)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
- PVC-Schlauch (4,6 mm)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
- Silikonschlauch (4,6 mm; 1 mm)	
Spatel:	
- Einmal-Rührspatel (PS)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
- Einwegspatel (mikro, antistatisch)	VWR International GmbH, Darmstadt
Verbindungsstücke	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
U-437 (Edelstahl, 10-32-Gewinde, für OD 1/16'')	
Verschlussfolie Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Zentrifugalfilter Centriprep™ (Cut-off 3 kDa)	Millipore UFC500396

## A4 Analytische Instrumente

### Auflichtmikroskop

Gerät	Stereomikroskop Wild M3C
Firma	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Kamera	ColorView
Firma	Olympus
Vergößerung	siehe Datenbalken
Datenbanksystem	analySIS docu /Olympus SIS GmbH

### Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Gerät	XL30 ESEM
Firma	FEI (Eindhoven)
EDX Detektor	Si(Li) - Detektor
Firma	EDAX
Detektor (bildgebend)	Everhart-Thornley-Detektor
Vergößerung	siehe Datenbalken
Probenbühne	euzentrisch, motorisiert
Probenkammer	284 mm Durchmesser
Vakuumsystem	Turbomolekularpumpensystem
Datenbanksystem	Scandium 5.1 / Olympus SIS GmbH

### Gasadsorption

Gerät	ASAP 2020-Physisorption Analyzer
Firma	Micromeritics Instrument Corporation (Norcross, USA)
Druckbereich	0-127 kPa
Porenweiten	0,4-500 nm
Porenweiten	<2 nm nach DIN 66135 [345]
Porenweiten	2-50 nm nach DIN 66134 [346]
Gase	Stickstoff (0,162 nm <sup>2</sup> bei 77 K) [252] Krypton (0,202 nm <sup>2</sup> bei 77 K) [252]
Software	V3.05 H

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gerät Agilent	1200 Series
Firma	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
Autosampler	Automated Sample Injector ALS G1316A
Thermostat	Thermostat FC/ALS Therm G1330B
Säulenofen	TCC G1316A
Detektor	Diodenarraydetektor (DAD) G1315D Fluoreszenzdetektor FLD G1321A
Lichtquelle	Deuterium- und Wolframlampe 190-950 nm
Durchflusszelle	Standard: 10 mm optische Weglänge, V = 13 µL, max. 120 bar
Pumpe	Quaternär G1311A mit Degasser G1322A
Flussrate	0,1-5 mL min <sup>-1</sup>
Software	ChemStation (Steuerung, Auswertung), Origin <sup>®</sup> von OriginLab Corporation (Darstellung)

### **Bio-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Gerät Agilent	1260 Infinity Series, BIOinert,
Firma	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
Autosampler	1260 Infinity HiP Bio ALS G5667A
Thermostat	1290 Infinity Autosampler Thermostat G1330B
Säulenofen	1290 Infinity TCC G1316C
Detektor	1260 Infinity Diodenarraydetektor (DAD) G4212B
Lichtquelle	Deuterium- und Wolframlampe 190-950 nm
Durchflusszelle	Max-Light Cartridge Cell 60 mm BIO G5615-60017
Pumpe	1260 Infinity Agilent Bio Quaternary pump G5611A
Flussrate	0,1-5 mL/min
Software	ChemStation (Steuerung, Auswertung), Origin <sup>®</sup> von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### **Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)**

Gerät	Exactive Benchtop Orbitrap
Firma	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Ionenquelle	Elektrosprayionisation (ESI)
Analysator	Orbitrap
Spannung	Capillary Voltage 77 V, Tube Lens Voltage 55 V,
Skimmer	Voltage 14 V, Spray Voltage 3,8 kV
Software	Exactive 1.1 SP5 (Steuerung), Xcalibur 2.2 SP1 (Auswertung)

### **Quecksilber-Intrusionsporosimetrie**

Gerät	Autopore III, WIN9400 Series
Firma	Micromeritics Instrument Corporation (Norcross, USA)
Druckbereich	Niederdruck 0-0,345 MPa
Hochdruck	bis 414,000 MPa
Porenweiten	Niederdruck 360-3,6 µm
Hochdruck	6-0,003 µm
	4 nm bis ca. 300 µm nach DIN 66133 [233]
Kontaktwinkel	140,000° nach DIN 66133 [233]
Oberflächenspannung	0,48Nm <sup>-1</sup> nach DIN 66133 [233]
Quecksilberdichte	13,5409 g cm <sup>-3</sup> nach Kalibrierung bei 22,2 °C
Software	V2.00 (Steuerung, Auswertung), Origin <sup>®</sup> von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

### **UV/Vis-Spektroskopie**

Gerät	Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer
Firma	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Optik	Zweistrahlspektrophotometer, Czerny-Turner-Monochromator
Lichtquelle	Xenon Blitzlampe
Spektrale Bandbreite	Variabel 1 nm, 2nm
Wellenlängenbereich	190-1100 nm
Detektor	Zwei Silizium-Photodioden
Software	Insight 1.4.40 (Steuerung), Origin <sup>®</sup> von OriginLab (Darstellung)



**Mikroplattenleser (Microplate reader)**

Gerät	SpectraMax Plus384
Firma	Molecular Devices (Germany) GmbH (Biberach an der Riss)
Lichtquelle	Xenon Blitzlampe
Spektrale	Bandbreite 2 nm
Wellenlängenbereich	190-1000 nm
Software	SoftMax <sup>®</sup> Pro 5.3 (Steuerung, Auswertung), Origin <sup>®</sup> von OriginLab Corporation (Northampton, USA) (Darstellung)

## A5 Geräte

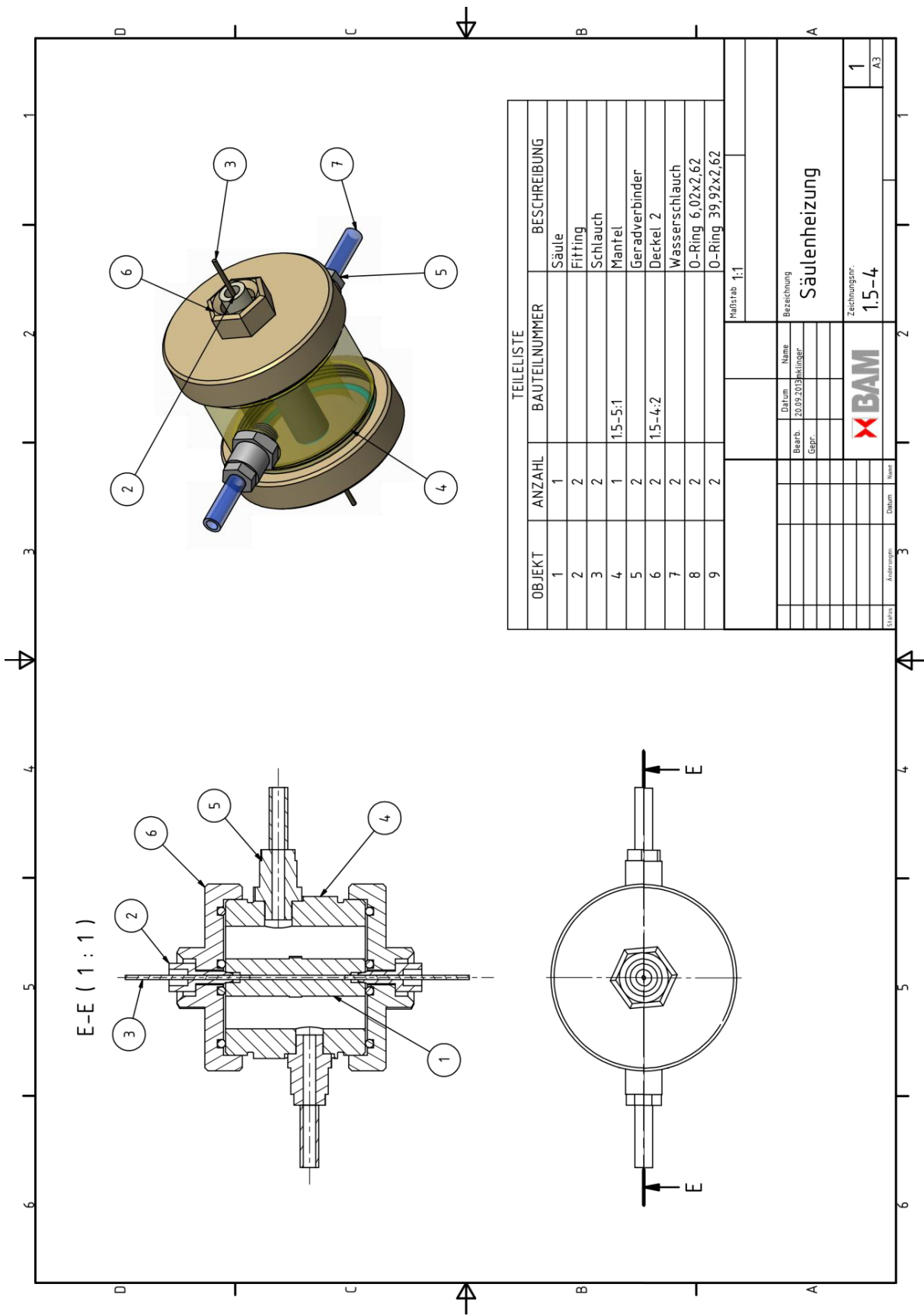
### Material, Bezeichnung

Analysenwaage, Mettler AM100  
 High Precision Pump, Model 480  
 Magnetrührer, Kontaktthermometer  
 MR Hei-Standard, EKT Hei-Con  
 MALDI-Target  
 MTP AnchorChip 600/384  
 Mikrotiterplatten-Schüttler, Titramax 101  
  
 Mikrotiterplatten-Waschautomat, ELx405 Select  
 Mikrowelle Discovery  
 pH-Elektrode, InLab Micro  
 pH-Meter, pH 211 Microprocessor  
  
 Pipetten  
 Eppendorf Research (variabel)  
 Eppendorf Research pro (Mehrkanal)  
 Pumpe Chemie-HYBRID-Pumpe PC 8/RC 6  
 (max.  $4 \times 10^{-4}$  bar)  
 Rotationsverdampfer, Laborota 4003 control  
  
 Spritzenpumpe, LA-30 (max. Fluss 1600 mL h<sup>-1</sup>)  
  
 Temperaturmessgerät, testo 925  
 Temperaturfühler, GTF 101 NiCr-Ni  
 Thermomixer compact  
 Trockenschrank, Modell 5002  
 Ultramikrowaage, UMT2  
 Vakuumtrockenschrank, Typ VT 6130 M-BL  
 Variable-Speed Pump Medium  
 Vortexmischer, Reax top  
  
 Zentrifuge, Mikro 220R

### Firma

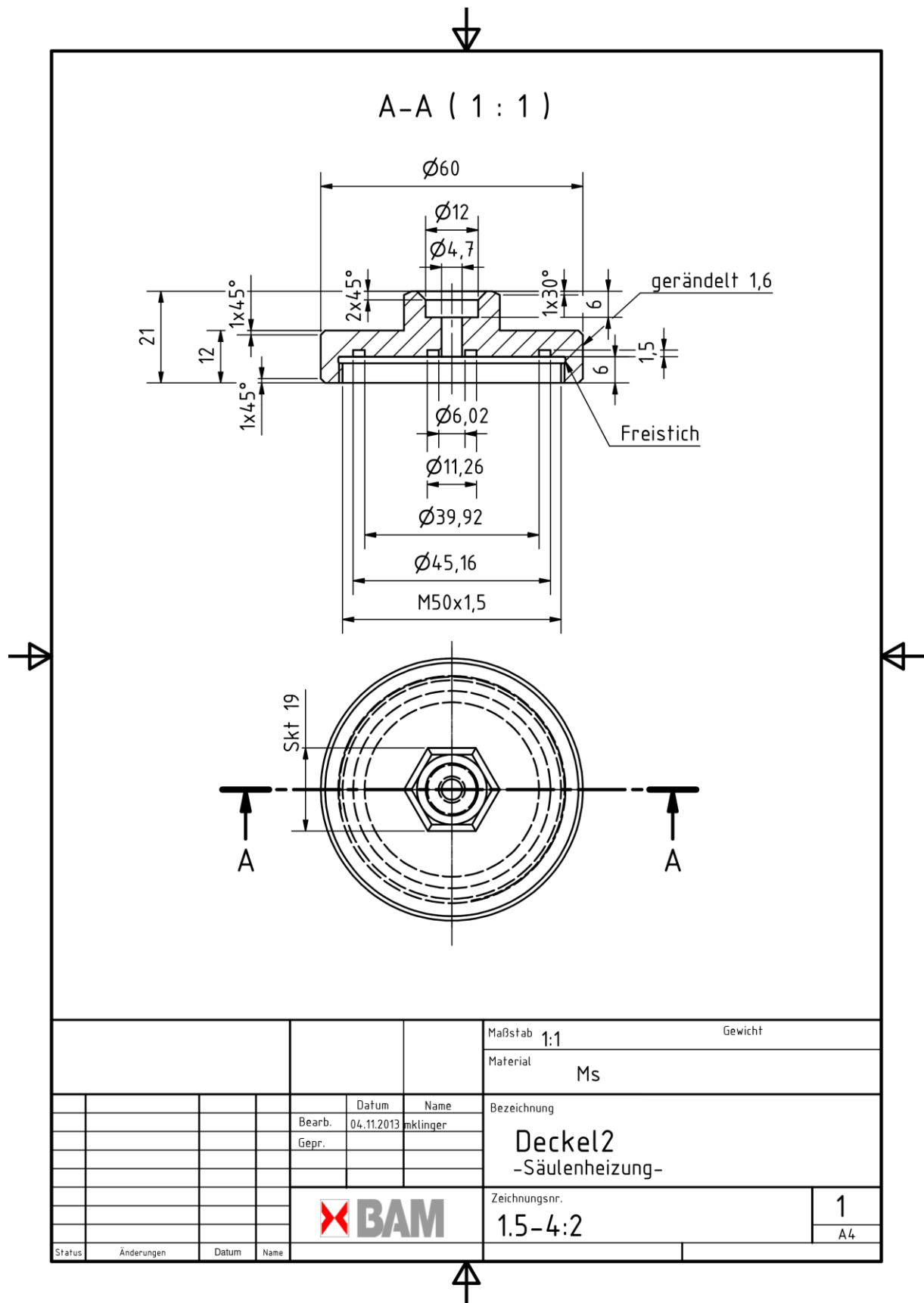
Mettler-Toledo GmbH, Gießen  
 Gynkotec (später Dionex, dann Thermo)  
 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,  
 Schwabach  
 Bruker Corporation, Billerica, USA  
  
 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,  
 Schwabach  
 BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall  
 CEM GmbH, Kamp-Lintfort  
 Mettler-Toledo GmbH, Gießen  
 HANNA Instruments Deutschland GmbH,  
 Kehl am Rhein  
 Eppendorf AG, Hamburg  
  
 Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim  
  
 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,  
 Schwabach  
 neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH,  
 Heidelberg  
 Testo AG, Lenzkirch  
 Greisinger electronic GmbH, Regenstauf  
 Eppendorf AG, Hamburg  
 Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach  
 Mettler-Toledo GmbH, Gießen  
 Heraeus Holding GmbH, Hanau  
 control company, Cat No 3386  
 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,  
 Schwabach  
 Andreas Hettich GmbH & Co. KG,  
 Tuttlingen

A6 Konstruktionszeichnung Säulenheizung



Zeichnung: M. Klinger (BAM)





Zeichnung: M. Klinger (BAM)

## A7 Messungen zur Verifizierung des AAAA-Verfahrens

*Tabelle A1: Proportionalitätsfaktorenbestimmung der internen Standards zur entsprechenden Aminosäure, Mittelwert, empirische und relative Standardabweichung.*

	Tyr-Faktor	Phe-Faktor
1	0,865	0,686
2	0,918	0,656
3	0,894	0,672
4	0,892	0,673
5	0,839	0,679
Mittelwert	0,882	0,673
s	0,027	0,010
s <sub>rel</sub> [%]	3,08	1,46

*Tabelle A2: Berechnete BSA-Konzentration [g/L] nach der Hydrolyse von 7 BSA-Proben (NIST) mit einer Konzentration von  $67,38 \pm 1,38$  g/L, Mittelwert, Wiederfindung, empirische und relative Standardabweichung.*

Probe BSA	Rechnung über Tyr [g/L]	Rechnung über Phe [g/L]
Nr. 1	71,885	69,234
Nr. 2	67,183	65,929
Nr. 3	65,731	67,041
Nr. 4	62,642	67,972
Nr. 5	67,751	73,332
Nr. 6	71,080	76,138
Nr. 7	68,817	72,882
Mittelwert [g/L]	67,870	70,361
s [g/L]	3,155	3,790
s <sub>rel</sub> [%]	4,648	5,387
Wiederfindung [%]	100,7	104,4

*Tabelle A3: Berechnete BSA-Konzentration [g/L] nach der Hydrolyse in der Mikrowelle, Mittelwert und empirische und relative Standardabweichung.*

Probe	Rechnung über Tyr [g/L]	Rechnung über Phe [g/L]
Nr. 1	9,40	9,04
Nr. 2	8,98	9,24
Nr. 3	8,89	9,16
Nr. 4	9,17	9,41
Nr. 5	9,11	9,46
Nr. 6	9,03	9,15
Mittelwert [g/L]	9,09	9,24
s [g/L]	0,18	0,16
s <sub>rel</sub> [%]	1,97	1,75

## A8 Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Reaktionsschema der Bildung von Meisenheimer-Ionen (oben) und Janowsky-Ionen (unten).
- 1.2 Schematische Darstellung eines Antikörpers (IgG).
- 1.3 Schematische Darstellung eines Hapten-Carrier-Immunogens.
- 1.4 PETN-Hapten und Analyt (PETN): neues Hapten mit einer Carbonatdiester-Gruppe, Entwurf basiert auf einem isosterischen Ersatz.
- 1.5 Chemische Struktur von 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure und von TNT.
- 2.1 ELISA-Schritte: 1. Beschichtung mit  $\alpha$ -Kaninchen-IgG und 2. Seruminkubation.
- 2.2 ELISA-Schritte: 3. Analytauftrag und 4. Competition durch Zugabe des Tracers.
- 2.3 ELISA-Schritt 5: Farbentwicklung und Stoppen dieser Reaktion mit Schwefelsäure.
- 2.4 Farbreaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und  $H_2O_2$  in Gegenwart von HRP.
- 2.5 Prinzip der Affinitätsreinigung.
- 2.6 Typisches Chromatogramm einer Affinitätschromatographie.
- 2.7 Reaktionsschema Epoxy-Methode.
- 2.8 Reaktionsschema Formyl-Kopplung.
- 2.9 Reaktionsschema Glutaraldehyd erster Schritt.
- 2.10 Reaktionsschema des zweiten Schritts der Glutaraldehyd-Methode, Immobilisierung des Proteins via Schiff'sche Base und deren Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid.
- 2.11 Reaktion von Glutaraldehyd zum cyclischen bzw. polymeren cyclischen Hemiacetal.
- 2.12 Reaktion von Glutaraldehyd zu  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Polymeren und mögliche Weiterreaktion zum cyclischen Acetal.
- 2.13 Reaktionsschema zur Umwandlung der Amimogruppen in Carboxylgruppen mit anschließender NHS-Aktivierung und Protein-Kopplung.
- 2.14 Reaktionsschema der NHS-Kopplung.
- 2.15 Reaktionsschema der Tresyl-Kopplung.
- 2.16 Silanisierung von Glas mit Glycidoxypentyltrimethoxysilan.
- 3.1 Schematischer Aufbau eines aktivierten Trägermaterials.
- 3.2 Polymerisation und Vernetzung von Pentaerythritoldimethacrylat mit Glycidylmethacrylat und Polyethylenglykol.
- 3.3 Strukturformel von Agarose.
- 3.4 Strukturformel von Cellulose.
- 3.5 Strukturformel von Formyl-Cellufine™.
- 3.6 Ternäres Glassystem  $Na_2O-B_2O_3-SiO_2$  mit Entmischungsbereich sowie Lage der Gläser vom VYCOR- und Pyrex-Typ.
- 3.7 Typische Isotherme einer Porenanalyse mittels Stickstoffadsorption.
- 4.1 Überblick einiger Proteinbestimmungsmethoden.
- 4.2 Kupferkomplexe mit Biuret und mit Amidbindung in alkalischer Lösung.
- 4.3 Bradfordreagenz Coomassie Brilliantblau G 250.
- 4.4 Strukturformel des BCA-Reagenzes und des violetten  $Cu^+$ -BCA-Komplexes, Absorption bei 562 nm.
- 4.5 Strukturformel von Merocyanin-Farbstoff.
- 5.1 Präparative HPLC-Reinigung des NHS-PETN-Esters.
- 5.2 Präparative HPLC-Reinigung von PETriN-CHA-POD.
- 6.1 PETN (Zielanalyt), bekanntes Hapten durch traditionelle Succinylierung (oben), neues Hapten mit einer Carbonatdiester-Gruppe, bioisosterer Ersatz (unten).
- 6.2 Reaktionsgleichung der Nitrierung von Pentaerythrit.
- 6.3 Reaktionsgleichung der Bildung des Carbamats aus dem Alkohol.

- 6.4 Reaktionsgleichung der Bindung des Linkers 1,6-Hexandiol.
- 6.5 Reaktionsgleichung der Oxidation der Hydroxylgruppe zur Carbonsäure.
- 6.6 Hochauflösende MS-Messung (negativer Mode, nach HPLC-Trennung) des PETN-Haptens.
- 6.7 Reaktionsschema: Aktivierung der Carbonsäure zum NHS-Ester.
- 6.8 Hochauflösendes MS-Spektrum des NHS-aktivierten Haptens (negativer Mode).
- 6.9 Ausgangsverbindung und Zwischenprodukte der Synthese des PETN-Haptens.
- 6.10 Reaktionsschema zur Amidbindung zwischen Protein und NHS-Ester.
- 6.11 Elutionsprofile der Gelchromatographie der unterschiedlich dicht gekoppelten Hapten-BSA-Konjugate.
- 6.12 MALDI-TOF/MS von BSA (schwarz) und von den drei löslichen, unterschiedlich dicht gekoppelten Hapten-BSA-Konjugaten.
- 6.13 MALDI-TOF/MS von POD und den beiden synthetisierten Tracerkonjugaten.
- 6.14 ELISA-Kurven von den Verdünnungen auf einer MTP zur Bestimmung der Bindungskonstante vom PETN-Hyperserum 5.
- 6.15 Sigmoidale Kalibrierungskurven der PETN-ELISAs von den PETN-Hyperseren 1-4.
- 6.16 PETN-Kalibrierungskurven mit Fehlerbalken (Dreifachmessung) und zusätzlicher Näherungskurve (blau) für einen 2,5%-ige Fehler der Extinktion.
- 6.17 PETN-Kalibrierungskurven mit Fehlerbalken (Dreifachmessung) und zusätzlicher Näherungskurve (blau) für einen 2,5%-ige Fehler der Extinktion.
- 6.18 PETN-Kalibrierungskurven. Die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung von drei Wiederholungen pro Konzentration.
- 7.1 TNT-Durchbruchskurve des unfunktionalisierten Trägermaterials Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy (Säulenvolumen 64,8 µL) zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Bindung.
- 7.2 TNT-Durchbruchskurven des unfunktionalisierten Trägermaterials zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Kapazität von Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy (Säulenvolumen 16,2 µL) bei Verwendung von unterschiedlichen MeOH-Zusätzen.
- 7.3 TNT-Durchbruchskurven des unfunktionalisierten Trägermaterials zur Bestimmung der unspezifischen TNT-Bindung von Fractogel<sup>®</sup> EMD-Epoxy (Säulenvolumen 16,2 µL) bei Zusatz von 10% MeOH und unterschiedlichem Gehalt an Tween<sup>®</sup> 20.
- 7.4 TNT-Durchbruchskurven der deaktivierten, synthetischen Trägermaterialien zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Auswertung mittels ELISA).
- 7.5 TNT-Durchbruchskurve von deaktivierter NHS-Sepharose<sup>™</sup>, deaktivierten Cellufine<sup>™</sup>-Formyl und von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500.
- 7.6 REM-Aufnahmen von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 3000 (links) und Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500 (rechts).
- 7.7 REM-Aufnahmen von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 3000 (links) und Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500 (rechts.) Der Referenzbalken für die oberen Bilder beträgt 2 µm, für die unteren 1 µm.
- 7.8 REM-Aufnahme mit teilweise verschlossenen Poren von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500.
- 7.9 Porengrößenbestimmung von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500 mittels Stickstoffadsorption (3h bei 110°C im Vakuum), Auftragung Desorption dV/dlog(D) gegen Porendurchmesser.
- 7.10 Porengrößenbestimmung von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 3000 mittels Stickstoffadsorption (3h bei 110°C im Vakuum), Auftragung Desorption dV/dlog(D) gegen Porendurchmesser.
- 7.11 Porenbestimmung mittels Hg-Porosimetrie von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 1500.
- 7.12 Porenbestimmung mittels Hg-Porosimetrie von Amino-Trisopor<sup>™</sup> 3000.
- 7.13 Reaktionschema der Aktivierung eines Amino-Trägermaterials mit einem Bis-NHS-Ester.
- 7.14 Proteinkopplung an dem NHS-aktivierten Trägermaterial.
- 7.15 Hydrolyse des NHS-aktivierten Trägermaterials.
- 7.16 Kalibriergerade von N-Hydroxysuccinimid.



- 8.1 BCA-Test: Extinktionen nach unterschiedlich langen Entwicklungszeiten von BSA-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen (links), Ausschnittsvergrößerung (rechts).
- 8.2 Zeitliche Entwicklung des BCA-Tests der BSA-Proben mit den Konzentrationen 0,250 g/L und 0,5 g/L, angenähert mit der Funktion "Exponential associate".
- 8.3 pH-Abhängigkeit der Immobilisierung mit Bis-NHS-Ester, Bestimmung mittels BCA-Test.
- 8.4 Reaktionsschema zur Dabsyl-Kopplung an Proteine.
- 8.5 MALDI-TOF/MS-Spektren von Dabsyl-BSA und BSA.
- 8.6 MALDI-TOF/MS-Spektren von weitgehend nativem, Dabsyl-BSA und von BSA.
- 8.7 Reaktionschema zur Silanisierung.
- 8.8 Reaktionsschema zur Umwandlung der Amimogruppen in Carboxylgruppen mit anschließender NHS-Aktivierung und Protein-Kopplung.
- 8.9 Verschiedene mit Dabsyl-BSA gekoppelte Trisopor™-Proben.
- 8.10 Verschiedene mit Dabsyl-BSA gekoppelte Trisopor™-Proben, im saurem Milieu, Proben analog Abb. 8.9.
- 8.11 Funktionsweise der Mikrowelle-Discovery der Firma CEM.
- 8.12 Aufbau der Reaktionskammer der Firma CEM für die Hydrolyse in der Mikrowelle.
- 8.13 Wasser (oben) und Dabsyl-BSA (unten) nach Erhitzung in 300 µL-Gasphasenhydrolyse-Reaktionsgefäßen.
- 8.14 Reaktionsgefäße für die Mikrowelle mit unterschiedlichen Volumina: 300 µL, 1,5 mL und 10 mL (links), Mikrowelleneinsatz der Firma CEM für 1,5 mL-HPLC-Gläschen (rechts).
- 8.15 Dabsyl-BSA-Lösung nach Erhitzung in HPLC-Gläschen im Standardeinsatz.
- 8.16 Modifizierte HPLC-Gläschen-Halter für die Hydrolyse-Reaktionskammer der Mikrowelle.
- 8.17 Mit Dabsyl-IgG (oben) bzw. Dabsyl-BSA (unten) gekoppelte Trägermaterialien, pH 7,6.
- 8.18 Mit Dabsyl-IgG (oben) bzw. Dabsyl-BSA (unten) gekoppelte Trägermaterialien nach Zugabe von 6 M HCl.
- 8.19 Teilhydrolyse der zuvor mit Dabsyl-BSA immobilisierten Trägermaterialien.
- 8.20 Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe, F), L-Tyrosin (Tyr, Y) und ihre entsprechenden internen Standards, L-Homophenylalanin (HPhe) und L-Homotyrosin (HTyr).
- 8.21 Chromatogramme der Hydrolyse-Blindproben mit und ohne Zusatz von Phenol, Hydrolysedauer 20 bzw. 25 min.
- 8.22 Chromatogramme von einer Blindprobe nach 20 min Hydrolyse mit Phenol und einer Aminosäuremischung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl unter Zusatz von 1,25 mM Tryptophan, 2,5 mM Glutamin und 2,5 mM Asparagin, sowie des internen Standards HTyr und HPhe und des Additivs Phenol.
- 8.23 L-Phenylalanin (Phe, F) und L-Tyrosin (Tyr, Y) und ihre jeweiligen internen Standards, 4-Fluor-DL-phenylalanin (FPhe) und L-Homotyrosin (HTyr).
- 8.24 Chromatogramm nach der Hydrolyse des Aminosäurestandards und der internen Standards mit und ohne Zusatz von Phenol bei der Hydrolyse (hold-time 20 min).
- 8.25 Chromatogramm nach der Hydrolyse der Aminosäuren und der internen Standards mit und ohne Zusatz von Phenol bei der Hydrolyse (hold-time 25 min).
- 8.26 Chromatogramme von einer Aminosäuremischung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl unter Zusatz von 1,25 mM Tryptophan, 2,5 mM Glutamin und 2,5 mM Asparagin und einer Blindprobe.
- 8.27 Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung (NIST 2389a) in 0,1 M HCl mit den zugesetzten internen Standards Homotyrosin (HTyr) und 4-Fluorphenylalanin (FPhe) sowie einer Blindprobe (blau).
- 8.28 Kalibriergerade von Phe und Tyr bei 215 nm in einer doppellogarithmischen Darstellung. Die Ergebnisse wurden auf den entsprechenden internen Standard normiert.
- 8.29 Chromatogramm von hydrolysiertem Serumalbumin (NIST SRM 927e).

- 8.30 Der gemessene Peak von FPhe von hydrolysiertem Serumalbumin (NIST 927e) und der angepasste Peak mit dem Asym2Sig Modell.
- 8.31 Phe-Peaks der Chromatogramme von hydrolysierten Serumalbumin (NIST SRM 927e, zertifiziertes Referenzmaterial) zur Bestimmung der Nachweisgrenze.
- 8.32 Chromatogramm von hydrolysierten Hepcidin-25 plus internen Standard sowie einer Blindprobe (blau).
- 8.33 Chromatogramme von hydrolysiertem Mausserum (links) und von hydrolysiertem Serum menschlichen Ursprungs (rechts) sowie jeweils einer Blindprobe (blau).
- 8.34 Chromatogramm einer Probe von hydrolysiertem Rinder-IgG (links) und von hydrolysiertem Magermilch sowie jeweils einer Blindprobe (blau).
- 8.35 Tyr-Peaks nach Hydrolyse von mit BSA-gekoppelten Trägermaterialien und die daraus berechneten Immobilisierungsdichten.
- 9.1 TNT-ELISA mit den Seren bzw. den korrespondierenden IgG-Fraktionen.
- 9.2 Reaktionsgleichung der Kopplungsreaktion von 6-(2,4,6-Trinitrophenyl)hexansäure (TN6PHA) an Trisopor™.
- 9.3 NHS-Aktivierung von 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure unter Verwendung des Aktivierungsreagenzes DCC. Bei der Reaktion entsteht als Nebenprodukt Dicyclohexylharnstoff, welches als Niederschlag ausfällt.
- 9.4 Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung der NHS-aktivierten HiTrap™-Säule.
- 9.5 Elutionsprofil der Affinitätssäule mit 4-Nitrophenylgruppe als Ligand. Der Nachweis der eluierten anti-TNT-Antikörper des aufgetragenen K2B12-Serums erfolgte mittels TNT-ELISA
- 9.6 Überprüfung der TNT-Selektivität der 4-Nitrophenyl-Affinitätssäule durch Verwendung von PETN-Hyperimmunserums 3 (Negativserum). Der fraktionierte Durchfluss wurde mittels PETN-ELISA ausgewertet.
- 9.7 TNT-ELISA der Elutionsproben der 4-Nitrophenyl-Affinitätssäule bei pH 2,4 und pH 12 sowie unbehandeltes Serum zum Vergleich.
- 9.8 pH-Stabilität der Antikörper des Serums K2B12 in Abhängigkeit von der Zeit.
- 9.9 Kreuzreaktivitäten der Antikörper des K1B9-Serums zu 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure.
- 9.10 Kreuzreaktivität der Antikörper des K2B12-Serums zu der Substanzen 2-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure und 2,4-Dinitrophenylelessigsäure.
- 9.11 Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung der NHS-aktivierten HiTrap™-Säule.
- 9.12 TNT-ELISA der Elutionsproben der Dinitrophenyl-Affinitätssäule bei pH 2,4 und pH 12 sowie unbehandeltes Serum zum Vergleich.
- 9.13 Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung des Trisopor™-Materials. Die Diolgruppen werden oxidativ durch Natriumperiodat zu Aldehyden gespalten
- 9.14 Die Aldehydgruppen reagieren mit den Aminogruppen der PEG-Moleküle zu einer Schiff'schen Base. Es wurde H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>N-PEG-OH im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid vermittelt die Ausbildung einer stabilen sekundären Aminbindung. An die funktionale Gruppe, die Aminogruppe-(PEG-NH<sub>2</sub>), wird der N-(2,4-Dinitrophenyl)-6-aminocaprinsäure-NHS-Ester gekoppelt, sodass eine 2,4-Dinitrophenylgruppe als Ligand zur Verfügung steht.
- 9.15 HPLC-Chromatogramm der Affinitätsaufreinigung von anti-TNT-Antikörpern unter Verwendung einer Trisopor™-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden und PEG-3000 zur Unterbindung unspezifischer Bindungen, Detektion bei 280.

- 9.16 ELISA-Kurven des Durchlaufs (Verdünnung: 1:1500) sowie der Elution (Verdünnung: 1:150000) der Trisopor™-Säule mit 2,4-Dinitrophenyl-Liganden und PEG-3000.
- 9.17 ELISA-Kurven der anti-TNT-Antikörper nach der antigen-spezifischen Reinigung der TNT-Seren.
- 9.18 Schematische Darstellung der spezifischen anti-TNT-IgG-Aufreinigung mittels Haptensäule und anschließende Verwendung zur TNT-Anreicherung mittels einer aus den anti-TNT-IgG-Fractionen hergestellten TNT-Affinitätssäule.
- 10.1 HPLC-Chromatogramme der TNT-Affinitätssäulen (Säulenvolumen 64 µL) auf Basis von Sepharose™, Cellufine™ bzw. porösen Glas, Elution erfolgte mit 0,01 M Phosphorsäure, pH 2,26.
- 10.2 TNT-ELISA-Auswertung der im HPLC-Experiment (Abb. 10.1) gesammelten Fraktionen, Abschätzung der eluierten TNT-Menge der Affinitätssäule, basierend auf porösem Glas.
- 10.3 Ventilschaltungen für die Elutionsmethode der Affinitätssäule mit Elution auf die analytische C18-Säule.
- 10.4 Chromatogramme der analytischen Säule nach der sauren und der thermischen Elution einer TNT-Affinitätssäule (Trägermaterial: Cellufine™).
- 10.5 TNT-Peaks der Chromatogramme der analytischen Säule nach saurer und anschließender thermischer Elution der Affinitätssäulen, basiert auf den Trägermaterialien Cellufine™ und Trisopor™.
- 10.6 Thermische Elution einer TNT-Affinitätssäule (C-135 mit 64,8 µL), TNT-Menge wurde mittels ELISA nachgewiesen.
- 10.7 TNT-Peaks aus dem HPLC-Chromatogramm der C18-Säule, nach thermischer Elution der TNT-Affinitätssäulen (poröses Glas), welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von K1B9-IgG (Protein A gereinigt) hergestellt wurden.
- 10.8 K1B9-IgG-Menge, die zur Immobilisierung an 40 mg Trisopor™ 1500 verwendet wurde, versus TNT-Elution der entsprechenden TNT-Affinitätssäule (16,2 µL).
- 10.9 Aufbau der HPLC-Anlage für die Online-Methode (Tab. 5.1) mittels Denaturierung durch 100% Lösungsmittel (Methanol).
- 10.10 Erster Schritt der Online-Methode (Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel): TNT-Beladung und Waschen (PBS) der Säule über eine externe Pumpe (Ventilstellung 1→2).
- 10.11 Zweiter Schritt der Online-Methode: Denaturierung der Antikörper mit 100% MeOH (30 µL/min) und zusätzlicher Zustrom an Reinstwasser (570 µL/min) um TNT auf der analytischen Säule zu halten (Ventilstellung 1→6).
- 10.12 Dritter und letzter Schritt der Online-Methode (Elution mittels Denaturierung durch Lösungsmittel): TNT-Detektion mit Hilfe eines ACN-Gradienten (Ventilstellung 1→2).
- 10.13 Chromatogramme der analytischen Säule nach einer irreversiblen Elution (Denaturierung mittels 100% MeOH) einer TNT-Affinitätssäule (via Bis-NHS-Methode) und einer Vergleichssäule, an die BSA ebenfalls via Bis-NHS-Ester-Methode immobilisiert wurde.
- 10.14 Konstruktionsplan des Säulenofens zur thermischen Elution der TNT-Affinitätssäule.
- 10.15 Chromatogramm der analytischen Säule nach der thermischen Elution (Säulenofen wurde 5 min erhitzt).
- 10.16 Chromatogramm der analytischen Säule nach einer thermischen Elution (Säulenofen wurde 18 min erhitzt).
- 10.17 Aufbau der HPLC-Anlage für die Online-Methode mittels thermischer Elution.

- 10.18 Erster Schritt der thermischen Online-Methode: Beladen und Waschen der Affinitätssäule, (Ventilstellung 1→2).
- 10.19: Zweiter Schritt der thermischen Online-Methode: Heißes Wasser (> 80°C) wird 20 min lang durch den Mantel gepumpt, um die Antikörper auf der Affinitätssäule zu denaturieren (der Fluss der HPLC-Pumpe wird gestoppt).
- 10.20 Dritter Schritt der thermischen Online-Methode: Nach der Denaturierung der Antikörper wird die Probenlösung von der Affinitätssäule mit Reinstwasser (2 min, Fluss 0,2 mL/min) auf die monolithische C18-Säule überführt (Ventilstellung 1→6).
- 10.21 Vierter Schritt der thermischen Online-Methode: Durch Umstellen des Ventils (1→2) erfolgt im letzten Schritt die TNT-Detektion mit Hilfe eines ACN-Gradienten.
- 10.22 Durchbruchskurve einer TNT-Affinitätssäule (16,2 µL) mit porösem Glas als Trägermaterial, Detektion mittels ELISA.
- 10.23 Gesamtchromatogramm und Ausschnitt (3-5,5 min) der analytischen Säule nach einer thermischen Elution einer TNT-Affinitätssäule, TNT-Referenz-Lösung (rechts, blau).
- 10.24 Chromatogramme der analytischen Säule nach thermischer Elution der TNT-Affinitätssäule und der BSA-Säule.
- 10.25 Chromatogramm der analytischen Säule nach der thermischen Elution einer gesättigten TNT-Affinitätssäule (Säulenvolumen 64,8 µL, Immobilisierung via Bis-NHS-Methode) unter Verwendung der in Tabelle 5.3 aufgeführten Methode.
- 10.26 TNT-Peaks (links: 230 nm, rechts: 260 nm) der Chromatogramme der analytischen Säule nach der thermische Elution der TNT-Affinitätssäule sowie von TNT-Vergleichsproben.
- 10.27 Auftragung der eluierten TNT-Menge versus Peakfläche der TNT-Peaks.
- 10.28 Anti-TNT-IgG-Elutionsprofile der Seren K1B9 und K2B12 (jeweils 2 Elutionen) bei Verwendung der großen Dinitrophenyl-Affinitätssäule (Kap. 9).
- 10.29 TNT-Peaks der Chromatogramme der analytischen Säule nach den thermischen Elutionen der TNT-Affinitätssäulen, hergestellt aus anti-TNT-IgG<sub>K1B9</sub>- und anti-TNT-IgG<sub>K2B12</sub> (überladen bzw. teilbeladen).
- 10.30 Ausschnitte der Chromatogramme der Hydrolysate von Trisopor™ 1500, immobilisiert mit anti-TNT-Antikörpern mittels Glutaraldehyd- bzw. Bis-NHS-Ester-Verfahren.
- 10.31 Chromatogramme der Hydrolysate der Trisopor™-Affinitätsmaterialien von K1B9 und K2B12, bei Verwendung der anti-TNT-IgG-Fraktion (haptengereinigt), welche aus gleichen Serumsvolumina hergestellt wurden.
- 10.32 Tyr-Peaks (links) und Phe-Peaks (rechts) der Chromatogramme der Hydrolysate von drei verschiedenen Trisopor™-Affinitätsmaterialien.

## A9 Tabellenverzeichnis

- 1.1 Kenndaten und Eigenschaften von TNT und PETN.
- 1.2 Übersicht verschiedener monoklonaler anti-TNT-Antikörper mit deren Testmittelpunkten ( $IC_{50}$ ) und Nachweisgrenzen (LOD) der kompetitiven Assays.
- 1.3 Übersicht verschiedener polyklonaler anti-TNT-Antikörper mit deren Testmittelpunkten ( $IC_{50}$ ) und Nachweisgrenzen (LOD) der kompetitiven Assays.
- 4.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der kolorimetrischen Proteinbestimmungsmethoden sowie deren Optimierungsmöglichkeiten.
- 4.2 Methoden zur konventionellen, sauren Hydrolyse.
- 4.3 Optimierte Bestimmungen hydrolyseanfälliger Aminosäuren bei der sauren Hydrolyse.
- 4.4 Nebenreaktionen der verschiedenen Aminosäuren bei der Hydrolyse.
- 5.1 Vollständige Methode der TNT-Elution (Denaturierung durch 100% Lösungsmittel).
- 5.2 TNT-Elution nach thermischer Denaturierung.
- 5.3 Endgültige Methode der TNT-Elution (thermische Denaturierung).
- 6.1 Volumen der für die Synthese eingesetzten Haptenlösung, Kopplungsdichte des Hapten-BSA-Konjugats sowie die Gesamtkonzentration des erhaltenen Produkts.
- 6.2 Immunisierungsprotokoll und Entwicklung der Antikörperaffinität und der Serentiter.
- 6.3 Signalintensität und deren Standardabweichung ( $n=4$ ) der ELISA-Signale nach 60 minütiger Inkubation in Lösungen unterschiedlicher pH-Werte, Normierung der Intensität auf pH 7,6.
- 6.4 Signalintensität des ELISA-Signals nach Säureeinwirkung (5, 15 und 60 min).
- 6.5 Signalintensität und deren Standardabweichung ( $n=4$ ) der ELISA-Signale nach 60-minütiger Inkubation in ACN-haltigen Lösungen, Normierung der Intensität auf 0% ACN.
- 6.6 Signalintensität und deren Standardabweichung ( $n=4$ ) der ELISA-Signale nach 60 minütiger Inkubation in MeOH-haltigen Lösungen, Normierung der Intensität auf 0% MeOH.
- 6.7 Signalintensität der ELISA-Signale und deren Standardabweichung ( $n=4$ ) nach 60-minütiger Inkubation in unterschiedlich konzentrierten NaCl-Lösungen, Normierung der Intensität auf 8,5 g/L NaCl.
- 6.8 Kreuzreaktionen der polyklonalen anti-PETN-Antikörper gegen häufig verwendete Sprengstoffe und strukturell verwandte Verbindungen.
- 7.1 TNT-Bindungskapazitäten von Fractogel® EMD Epoxy.
- 7.2 Unspezifische TNT-Bindungskapazitäten von Fractogel® EMD-Epoxy (Volumen 16,2  $\mu$ L).
- 7.3 TNT-Bindungskapazitäten der untersuchten Trägermaterialien.
- 7.4 Unspezifische TNT-Bindungskapazitäten der naturstoffbasierten Trägermaterialien Toyo-pearl® AF Tresyl, Cellufine™-Formyl und von Amino-Trisopor™ 1500 an einer 64,8  $\mu$ L-Säule bzw. bezogen auf 1 mL deaktivierten Säulenmaterial.
- 7.5 Kenngrößen von Amino-Trisopor™ 1500 und Amino-Trisopor™ 3000.
- 7.6 Herstellerangaben und gemessene Daten von Amino-Trisopor™ 1500 und 3000.
- 7.7 Hydrolysiertes NHS-aktiviertes Trisopor™, gewaschen mit LM (Dioxan und ACN).
- 7.8 Hydrolysiertes NHS-aktiviertes Trisopor™, gewaschen mit PBS-Puffer, pH 6.
- 7.9 Theoretisch berechnete maximale IgG-Belegung (Monolayer) der porösen Gläser unter der Annahme, dass ein IgG-Molekül einen Platzbedarf von  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  benötigt.
- 7.10 Ligandendichte der porösen Gläser sowie den prozentualen Anteil, der zur Kopplung verwendet werden müsste, um einen IgG-Monolayer zu erhalten, unter der Annahme, dass ein IgG-Molekül einen Platzbedarf von  $1,32 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  benötigt.
- 8.1 Kopplungsdichte der Dabsyl-BSA-Konjugate sowie die Konzentration der Lösungen.

- 8.2 Ergebnisse aus der Teilhydrolyse der mit Dabsyl-BSA gekoppelten porösen Gläser, Auflistung in abnehmender Kopplungsrate, Proben siehe Abbildung 8.9.
- 8.3 Repräsentative Kopplungsdichte aktivierter und reaktiver Toyopearl<sup>®</sup>-Trägermaterialien.
- 8.4 Kenngrößen und Immobilisierungsmethoden der untersuchten Trägermaterialien.
- 8.5 Bestimmung der Dabsyl-BSA Kopplungsdichte mittels Differenzmethode für die mit Dabsyl-BSA gekoppelten Trägermaterialien.
- 8.6 Bestimmung der Dabsyl-IgG Kopplungsdichte mittels Differenzmethode für die mit Dabsyl-IgG gekoppelten Trägermaterialien.
- 8.7 Dabsyl-BSA-Kopplungsdichte, berechnet über Teilhydrolyse und Differenzmethode.
- 8.8 Gemessene BSA-Konzentration der BSA-NIST-Lösung, deren empirische Standardabweichung  $s$  ( $n=7$ ), relative Standardabweichung  $s_{\text{rel}}$  und Wiederfindung, getrennte Berechnungen basierend auf den Bestimmungen von Tyr und Phe
- 9.1 Kreuzreaktivitäten [%] der anti-TNT-Antikörper des Seren zu 2-Nitrophenylelessigsäure, 3-Nitrophenylelessigsäure, 4-Nitrophenylelessigsäure, 4-(4-Nitrophenyl)buttersäure und 2,4 Dinitrophenylelessigsäure.
- 9.2 Bestimmung der Proteingehalte [ $\mu\text{g}$ ] von 20  $\mu\text{L}$  unbehandelten K2B12-Serums sowie von den Durchlauf- und Elutionsfraktionen (des HPLC-Laufs mit 20  $\mu\text{L}$  K2B12-Auftragung).
- 9.3 Bestimmung der IgG-Konzentrationen der Gesamt-IgG-Fraktionen (durch Protein A) und der spezifischen anti-TNT-IgG-Fraktionen von K1B9 und K2B12.
- 10.1 Theoretisch berechnete maximale IgG- und TNT-Kapazitäten von Trisopor<sup>™</sup> 1500.
- 10.2 TNT-Quantifizierung mittels der Chromatogramme der analytischen Säule nach saurer bzw. thermischer Elution der Affinitätssäulen (16,2  $\mu\text{L}$ ).
- 10.3 TNT-Kapazitäten der Affinitätssäulen (Volumen: 16,2  $\mu\text{L}$ ), an denen unterschiedliche IgG-Mengen immobilisiert wurden.
- 10.4 Elutionsvolumen und anti-TNT-IgG-Menge der Haptenreinigung von K1B9 und K2B12.
- 10.5 Anti-TNT-IgG-Menge der Haptenreinigung von K1B9 und K2B12 und Kennwerte der daraus hergestellten TNT-Affinitätssäulen.
- 10.6 Repräsentative Kapazitäten von Affinitätsmaterialien für kleine Moleküle.
- 10.7 Repräsentative Kapazitäten von Protein-A-Affinitätsmaterialien.
- 10.8 Ligandendichte (spezifisches anti-TNT-IgG) von verschiedenen TNT-Affinitätssäulen, Berechnung über TNT-Elution bzw. über AAAA des Affinitätsmaterials.
- A1 Proportionalitätsfaktorenbestimmung der internen Standards zur entsprechenden Aminosäure.
- A2 Berechnete BSA-Konzentration [ $\text{g/L}$ ] nach der Hydrolyse von sieben BSA-Nist-Proben.
- A3 Berechnete BSA-Konzentration [ $\text{g/L}$ ] nach der Hydrolyse in der Mikrowelle.

## Publikationen

Hesse A, Biyikal M, Rurack K, Weller MG: **Development of highly sensitive and selective antibodies for the detection of the explosive pentaerythritol tetranitrate (PETN) by bioisosteric replacement.** *Journal of Molecular Recognition* 2016, **29**(2):88-94.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jmr.2511>

Hesse A, Weller MG: **Protein quantification by derivatization-free high-performance liquid chromatography of aromatic amino acids.** *Journal of Amino Acids Vol.* 2016, Article ID 7374316, 8 pages, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7374316>





## Literaturverzeichnis

1. Wilbrand J: **Notiz über Trinitrotoluol**. *Annalen der Chemie und Pharmacie* 1863, **128**:178-179.
2. Swart K-H: **Haeußermann, Carl Friedrich**. In: *Neue Deutsche Biographie*. vol. 7; 1966: 459f, letzter Zugriff: 29.11.2016.
3. Dornberger U, Welsch T: **Explosivstoffe in Altlasten der Rüstungsproduktion**. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 1995, **7**(5):302-316.
4. Nyanhongo GS, Aichernig N, Ortner M, Steiner W, Guebitz GM: **A novel environmentally friendly 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) based explosive**. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2008, **27**(2):107-116.
5. Ramin S, Weller MG: **Extremely sensitive and selective antibodies against the explosive 2,4,6-trinitrotoluene by rational design of a structurally optimized hapten**. *Journal of Molecular Recognition* 2012, **25**(2):89-97.
6. Simonovic M, Milosevic-Zlatanovic S, Milosavic N, Vrvic MM, Simonovic B: **Characterization of recombinant antibodies for detection of TNT and its derivatives**. *Chemical Papers* 2009, **63**(4):391-398.
7. Zeck A, Weller MG, Niessner R: **Characterization of a monoclonal TNT-antibody by measurement of the cross-reactivities of nitroaromatic compounds**. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1999, **364**(1-2):113-120.
8. Agency E-USEP: **Technical Fact Sheet-2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)**. In., vol. 505-F-14-009; 2014: 1-8.
9. Rylott EL, Lorenz A, Bruce NC: **Biodegradation and biotransformation of explosives**. *Current Opinion in Biotechnology* 2011, **22**(3):434-440.
10. Eisentraeger A, Reifferscheid G, Dardenne F, Blust R, Schofer A: **Hazard characterization and identification of a former ammunition site using microarrays, bioassays, and chemical analysis**. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2007, **26**(4):634-646.
11. Singh S: **Sensors - An effective approach for the detection of explosives**. *Journal of Hazardous Materials* 2007, **144**(1-2):15-28.
12. Bradley MD: **2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) air concentrations, hemoglobin changes, and anemia cases in respirator protected TNT munitions demilitarization workers**. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2011, **84**(3):239-250.
13. Letzel S, Goen T, Bader M, Angerer J, Kraus T: **Exposure to nitroaromatic explosives and health effects during disposal of military waste**. *Occupational and Environmental Medicine* 2003, **60**(7):483-488.
14. Urbanski T: **Chemie und Technologie der Explosivstoffe**, vol. Band II: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; 1963.
15. **Semtex** [<https://de.wikipedia.org/wiki/Semtex>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
16. Steen H: **Handbuch des Explosionschutzes**. In: *Handbuch des Explosionschutzes*. Handbuch des Explosionschutzes; 2012.
17. **Nitropenta** [<https://de.wikipedia.org/wiki/Nitropenta>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
18. Köhler J, Meyer R, Homburg A: **Explosivstoffe**, 10 edn. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008.
19. Yinon J: **Classification of explosives and basic terms Chichester**. In: *Forensic and enviromental detection of explosives*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd; 1999.
20. **GESTIS - Stoffdatenbank. 2,4,6-Trinitrotoluol** [[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/034200.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/034200.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
21. Bauer D, Hempfling R, Simmleit N: **Ökochemische Eigenschaften und umweltchemisches Verhalten von Explosivstoffen in Rüstungsaltlasten**. In: *Bestandsaufnahme von Rüstungsaltlastverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland, Band 2 Explosivstofflexikon*. 1996.

22. Uzer A, Ercag E, Apak R: **Selective spectrophotometric determination of trinitrotoluene, trinitrophenol, dinitrophenol and mononitrophenol.** *Analytica Chimica Acta* 2004, **505**(1):83-93.
23. **SW-846 Test Method 8330A: Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)** [<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8330a.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
24. **Analytical examination of former munition plants: Compounds, methods and limits of detection (LOD)** [<http://www.r-haas.de/A5en.html>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
25. Batlle R, Carlsson H, Holmgren E, Colmsjö A, Crescenzi C: **On-line coupling of supercritical fluid extraction with high-performance liquid chromatography for the determination of explosives in vapour phases.** *Journal of Chromatography A* 2002, **963**(1-2):73-82.
26. Walsh ME, Ranney T: **Determination of nitroaromatic, nitramine, and nitrate ester explosives in water using solid-phase extraction and gas chromatography electron capture detection: Comparison with high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatographic Science* 1998, **36**(8):406-416.
27. Steinfeld JJ, Wormhoudt J: **Explosives detection: A challenge for physical chemistry.** *Annual Review of Physical Chemistry* 1998, **49**:203-232.
28. Stahl DC, Tilotta DC: **Screening method for nitroaromatic compounds in water based on solid-phase microextraction and infrared spectroscopy.** *Environmental Science & Technology* 2001, **35**(17):3507-3512.
20. **EU-Verordnung 185/2010.** In.: Amtsblatt der Europäischen Union; 2010.
30. **QS-B220 Desktop Explosives & Drug Trace Detector** [<http://www.implantsciences.com/products/desktop-explosives-drugs-trace-detector/>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
31. **Itemiser 4DX** [<http://www.morpho.com/en/aviation-border-security/detect-threats/etd-explosives-trace-detectors/itemiser-4dx>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
32. Job N: **Giftalarm am Flughafen: 69 Mitarbeiter erkrankt.** In: *Münchener Abendzeitung*. München: Münchener Abendzeitung; 2015.
33. Noll J: **69 Mitarbeiter erkranken wegen neuer Sprengstoffdetektoren.** In: *Augsburger Allgemeine*. Augsburg: Augsburger Allgemeine; 2015.
34. Bhattacharjee Y: **Combating terrorism - New efforts to detect explosives require advances on many fronts.** *Science* 2008, **320**(5882):1416-1417.
35. **Authorities struggle to identify Burgas bomber, who may have been wearing a wig.** In.: *The Times of Israel*; 2012., letzter Zugriff: 29.11.2016.
36. Furton KG, Myers LJ: **The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives.** *Talanta* 2001, **54**(3):487-500.
37. Harper RJ, Almirall JR, Furton KG: **Identification of dominant odor chemicals emanating from explosives for use in developing optimal training aid combinations and mimics for canine detection.** *Talanta* 2005, **67**(2):313-327.
38. Caygill JS, Davis F, Higson SPJ: **Current trends in explosive detection techniques.** *Talanta* 2012, **88**:14-29.
39. Kranz WD, Strange NA, Goodpaster JV: **"Fooling fido"-chemical and behavioral studies of pseudo-explosive canine training aids.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, **406**(30):7817-7825.
40. Rembold M: **Sprengstoff und Drogen auf der Spur.** In., vol. 9; 2012.
41. Little JR, Eisen HN: **Preparation and characterization of antibodies specific for 2,4,6-trinitrophenyl group.** *Biochemistry* 1966, **5**(11):3385-&.
42. Goldman ER, Cohill TJ, Patterson CH, Anderson GP, Kusterbeck AW, Mauro JM: **Detection of 2,4,6-trinitrotoluene in environmental samples using a homogeneous fluoroimmunoassay.** *Environmental Science & Technology* 2003, **37**(20):4733-4736.
43. Ciumasu IM, Kramer PM, Weber CM, Kolb G, Tiemann D, Windisch S, Frese I, Ketrup AA: **A new, versatile field immunosensor for environmental pollutants - Development and proof of principle with TNT, diuron, and atrazine.** *Biosensors & Bioelectronics* 2005, **21**(2):354-364.

44. Shankaran DR, Gobi KV, Matsumoto K, Imato T, Toko K, Miura N: **Highly sensitive surface plasmon resonance immunosensor for parts-per-trillion level detection of 2,4,6-trinitrophenol.** *Sensors and Actuators B-Chemical* 2004, **100**(3):450-454.
45. Medintz IL, Goldman ER, Lassman ME, Hayhurst A, Kusterbeck AW, Deschamps JR: **Self-assembled TNT biosensor based on modular multifunctional surface-tethered components.** *Analytical Chemistry* 2005, **77**(2):365-372.
46. Smith RG, D'Souza N, Nicklin S: **A review of biosensors and biologically-inspired systems for explosives detection.** *Analyst* 2008, **133**(5):571-584.
47. Wang J, Liu GD, Wu H, Lin YH: **Sensitive electrochemical immunoassay for 2,4,6-trinitrotoluene based on functionalized silica nanoparticle labels.** *Analytica Chimica Acta* 2008, **610**(1):112-118.
48. Walter MA, Panne U, Weller MG: **A Novel Immunoreagent for the Specific and Sensitive Detection of the Explosive Triacetone Triperoxide (TATP).** *Biosensors* 2011, **1**(3):93-106.
49. Walter MA, Pfeifer D, Kraus W, Emmerling F, Schneider RJ, Panne U, Weller MG: **Triacetone Triperoxide (TATP): Hapten Design and Development of Antibodies.** *Langmuir* 2010, **26**(19):15418-15423.
50. Song JA, Wang RM, Wang YQ, Tang YR, Deng AP: **Hapten Design, Modification and Preparation of Artificial Antigens.** *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2010, **38**(8):1211-1218.
51. Goodrow MH, Hammock BD: **Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules.** *Analytica Chimica Acta* 1998, **376**(1):83-91.
52. Ostmark H, Wallin S, Ang HG: **Vapor Pressure of Explosives: A Critical Review.** *Propellants Explosives Pyrotechnics* 2012, **37**(1):12-23.
53. MacCrehan W, Moore S, Hancock D: **Development of SRM 2907 Trace Terrorist Explosives Simulants for the Detection of Semtex and Triacetone Triperoxide.** *Analytical Chemistry* 2011, **83**(23):9054-9059.
54. Moore S, Schantz M, MacCrehan W: **Characterization of Three Types of Semtex (H, 1A, and 10).** *Propellants Explosives Pyrotechnics* 2010, **35**(6):540-549.
55. Dodd V, Norton-Taylor R, Harris P: **Cargo plane bomb found in Britain was primed to blow up over US.** In: *The Guardian*. New York: The Guardian; 2010.
56. Schütt C, Bröker B: **Das funktionierende Immunsystem.** In: *Grundwissen Immunologie*. 2. edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009: 270.
57. Linke R: **Immunologische Techniken.** In: *Bioanalytik*. Edited by Lottspeich F, Zorbas H. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1998: 67-102.
58. Yoshida M, Masuda A, Kuo TT, Kobayashi K, Claypool SM, Takagawa T, Kutsumi H, Azuma T, Lencer WI, Blumberg RS: **IgG transport across mucosal barriers by neonatal Fc receptor for IgG and mucosal immunity.** *Springer Seminars in Immunopathology* 2006, **28**(4):397-403.
59. Besser TE, McGuire TC, Gay CC, Pritchett LC: **Transfer of functional immunoglobulin-G (IgG) antibody into the gastrointestinal-tract accounts for IgG clearance in calves.** *Journal of Virology* 1988, **62**(7):2234-2237.
60. Nelson D, Cox M: **Komplementäre Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden: Immunsystem und Immunglobuline.** In: *Lehninger Biochemie*. 3. edn. Heidelberg: Springer-Verlag; 2001: 231-244.
61. Nelson D, Cox M: **DNA-Rekombination.** In: *Lehninger Biochemie*. 3. edn. Heidelberg: Springer-Verlag; 2001: 1057-1061.
62. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: **Der Experimentator Immunologie**, 3. edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2008.
63. Sherry JP: **Environmental Chemistry - The Immunoassay Option.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 1992, **23**(4):217-300.
64. Grumbach IM, Veh RW: **Sulfo-N-hydroxysuccinimide activated long-chain biotin - a new microtitre plate assay for the determination of its stability at different pH values and its reaction-rate with protein-bound amino-groups.** *Journal of Immunological Methods* 1991, **140**(2):205-210.

65. Hermanson GT. Preparation of hapten-carrier immunogen conjugates. In: Bioconjugate Techniques. 1st ed. Oxford UAPp-: **Preparation of hapten-carrier immunogen conjugates**. In: *Bioconjugate Techniques*. Oxford: Academic Press; 1996: 419-459.
66. Newsome WH, Yeung JM, Collins PG: **Development of enzyme-immunoassay for captan and its degradation product tetrahydrophthalimide in foods**. *Journal of Aoac International* 1993, **76**(2):381-386.
67. Fránek M: **Structural aspects of steroid-antibody specificity**. *Journal of Steroid Biochemistry* 1987, **28**(1):95-108.
68. Blackburn GM, Beadham IG, Adams H, Hutchinson AP, Nicklin S: **Synthesis of haptens and their protein conjugates for immunological determination of nitrate esters and nitramines**. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 2000(2):225-230.
69. Gallacher G, Smith CZ, Hawkes GE: **Synthesis of a homovanillic-acid immunogen that incorporates an isosteric group designed to generate antibodies with improved specificity**. *Biogenic Amines* 1995, **11**(1):49-62.
70. Fitzpatrick FA, Bundy GL: **Hapten mimic elicits antibodies recognizing prostaglandin-E2**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978, **75**(6):2689-2693.
71. Hollemann AF, Wiberg N: **Lehrbuch der anorganischen Chemie**. Berlin: Walter de Gruyter; 2007.
72. Langmuir I: **Isomorphism, isosterism and covalence**. *Journal of the American Chemical Society* 1919, **41**:1543-1559.
73. Grimm HG: **On construction and sizes of non-metallic hydrides**. *Zeitschrift Fur Elektrochemie Und Angewandte Physikalische Chemie* 1925, **31**:474-480.
74. Grimm HG: **The systematics of the chemical compounds from the standpoint of the atomic research, at the same time several problems of experimental chemistry**. *Naturwissenschaften* 1929, **17**:535-540.
75. Erlenmeyer H: **Les composés isomères et le problème de la ressemblance en chimie**. *Bulletin De La Société De Chimie Biologique* 1948, **30**(11-1):792-805.
76. Langdon SR, Ertl P, Brown N: **Bioisosteric Replacement and Scaffold Hopping in Lead Generation and Optimization**. *Molecular Informatics* 2010, **29**(5):366-385.
77. Brown N, Mannhold R, Kubinyi H, Gerd Folkers G: **Bioisosteres in Medicinal Chemistry**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012.
78. Friedman HL: **Influence of isosteric replacements upon biological activity**. Washington, DC, USA: National Academy of Sciences; 1951.
79. Erlenmeyer H, Berger E, Leo M: **Relationships between the structure of antigens and the specificity of antibodies**. *Helvetica Chimica Acta* 1933, **16**:733-738.
80. Hanse FK: **Dissertation: Synthese, Analytik und biologische Eigenschaften von 2,4,5-substituierten Pyrimidin-Derivaten**. In. Hamburg: Universität Hamburg; 2009.
81. Nassar MN, Agha BJ, Digenis GA: **Effects of structural variations on the rates of enzymatic and nonenzymatic hydrolysis of carbonate and carbamate esters**. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1992, **81**(3):295-298.
82. Bowen J, Noe LJ, Sullivan BP, Morris K, Martin V, Donnelly G: **Gas-phase detection of trinitrotoluene utilizing a solid-phase antibody immobilized on a gold film by means of surface plasmon resonance spectroscopy**. *Applied Spectroscopy* 2003, **57**(8):906-914.
83. Keuchel C, Niessner R: **Rapid field screening-test for determination of 2,4,6-Trinitrotoluene in water and soil with immunofiltration**. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1994, **350**(7-9):538-543.
84. Charles PT, Shriver-Lake LC, Francesconi SC, Churilla AM, Rangasammy JG, Patterson CH, Deschamps JR, Kusterbeck AW: **Characterization and performance evaluation of in vivo and in vitro produced monoclonal anti-TNT antibodies for the detection of TNT**. *Journal of Immunological Methods* 2004, **284**(1-2):15-26.
85. Shankaran DR, Kawaguchi T, Kim SJ, Matsumoto K, Toko K, Miura N: **Evaluation of the molecular recognition of monoclonal and polyclonal antibodies for sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by indirect competitive surface plasmon resonance immunoassay**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, **386**(5):1313-1320.

86. Bromage ES, Lackie T, Unger MA, Ye J, Kaattari SL: **The development of a real-time biosensor for the detection of trace levels of trinitrotoluene (TNT) in aquatic environments.** *Biosensors & Bioelectronics* 2007, **22**(11):2532-2538.
87. Whelan JP, Kusterbeck AW, Wemhoff GA, Bredehorst R, Ligler FS: **Continuous-flow immunosensor for detection of explosives.** *Analytical Chemistry* 1993, **65**(24):3561-3565.
88. Green TM, Charles PT, Anderson GP: **Detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater using a reversed-displacement immunosensor.** *Analytical Biochemistry* 2002, **310**(1):36-41.
89. Krämer PM, Kremmer E, Weber CM, Ciumasu IM, Forster S, Kettrup AA: **Development of new rat monoclonal antibodies with different selectivities and sensitivities for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and other nitroaromatic compounds.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, **382**(8):1919-1933.
90. Hunt WD, Lee S-H, Stubbs DD, Edmonson PJ: **Clues From Digital Radio Regarding Biomolecular Recognition.** *Ieee Transactions on Biomedical Circuits and Systems* 2007, **1**(1):50-55.
91. Wilson R, Clavering C, Hutchinson A: **Electrochemiluminescence enzyme immunoassays for TNT and pentaerythritol tetranitrate.** *Analytical Chemistry* 2003, **75**(16):4244-4249.
92. Anderson GP, Moore M, Charles PT, Goldman ER: **Bead based fluid array detection of pentaerythritol tetranitrate: Comparison of monoclonal vs. lama polyclonal antibodies.** *Analytical Letters* 2010, **43**(18):2913-2922.
93. **EPA Method 4050 Trinitrotoluene (TNT) Explosives in Soil by Immunoassay** [<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/4050.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
94. **EPA Method 4051: Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) in Soil by Immunoassay** [<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/4051.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
95. Ramin S: **Diplomarbeit: Entwicklung eines neuartigen Haptens zur Herstellung von TNT-Antikörpern.** Berlin: Humboldt Universität Berlin; 2010.
96. Leginus JM: **Antigen for detecting presence and amt. of nitrate ester of polyol - comprises pentaerythritol tri-nitrate coupled to carrier protein e.g. thyroglobulin via alkyl carboxy linking gp., partic. glutaric acid.** In.: Westinghouse Electric Corp (Wese-C); 1994.
97. Leginus JM: **Method of detecting nitrate esters.** *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents* 1994, **1168**(4):2592.
98. Aojula HS, Offerman S, Aojula RR, Hutchinson AP, Nicklin S, Clarke DJ: **Cloaking cytolytic peptides for liposome-based detection and potential drug delivery.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2002, **1564**(1):73-81.
99. Yalow RS, Berson SA: **Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.** *Journal of Clinical Investigation* 1960, **39**(7):1157-1175.
100. Wood WG: **Immunoassays & Co.: Past, Present, Future? - A Review and Outlook from Personal Experience and Involvement over the Past 35 Years.** *Clinical Laboratory* 2008, **54**(11-12):423-438.
101. Cervino C, Weber E, Knopp D, Niessner R: **Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies.** *Journal of Immunological Methods* 2008, **329**(1-2):184-193.
102. Bahlmann A, Carvalho JJ, Weller MG, Panne U, Schneider RJ: **Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetrizine in surface and wastewaters.** *Chemosphere* 2012, **89**(11):1278-1286.
103. Schneider RJ: **Environmental immunoassays.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, **375**(1):44-46.
104. Eck D, Kurth M, Macmillan C: **Trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds - Immunoassay methods.** In: *Immunochemical methods for environmental Analysis*. Edited by van Emon JM, Mumma RO, vol. 442. Washington, D.C., USA: American Chemical Society; 1990: 79-94.
105. Porstmann T, Kiessig ST: **Enzyme-immunoassay techniques - An overview.** *Journal of Immunological Methods* 1992, **150**(1-2):5-21.
106. Engvall E, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin-G.** *Immunochemistry* 1971, **8**(9):871-&.

107. Avrameas S, Guilbert B: **A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme labeled antibodies.** *European Journal of Immunology* 1971, **1**(5):394-396.
108. Walter A: **Dissertation: Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Triacetotriperoxid (TATP).** Berlin: Humboldt Universität Berlin; 2014.
109. Dudley R: **Chemiluminescence immunoassay: an alternative to RIA.** *Laboratory Medicine* 1990, **21**:216-222.
110. Josephy PD, Eling T, Mason RP: **The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine - free-radical and charge-transfer complex intermediates.** *Journal of Biological Chemistry* 1982, **257**(7):3669-3675.
111. Rodbard D: **Statistical estimation of minimal detectable concentration (sensitivity) for radioligand assays.** *Analytical Biochemistry* 1978, **90**(1):1-12.
112. Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IGM, Raab GM, Rodbard D, Rodgers RPC: **Guidelines for immunoassay data-processing.** *Clinical Chemistry* 1985, **31**(8):1264-1271.
113. Liddell E, Week I: **Antikörper-Techniken.** Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1996.
114. Weller M: **Dissertation: Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISA) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden:** Technische Universität München; 1992.
115. Winklmeier M, Weller MG, Mangler J, Schlosshauer B, Niessner R: **Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides.** *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1997, **358**(5):614-622.
116. Abraham GE: **Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17beta.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1969, **29**(6):866-+.
117. Ekins R: **The "Precision profile": Its use in RIA - Assessment and design.** *The Ligand Quarterly* 1981, **4**(2):33-44.
118. Mallik R, Hage DS: **Affinity monolith chromatography.** *J Sep Sci* 2006, **29**(12):1686-1704.
119. Ostrove S: **Affinity chromatography: general methods.** *Methods Enzymol* 1990, **182**:357-371.
120. Roque A, Lowe C: **Affinity Chromatography.** In: *Affinity Chromatography.* Edited by Zachariou M, vol. 421: Humana Press; 2008: 1-23.
121. Labrou NE: **Design and selection of ligands for affinity chromatography.** *Journal of Chromatography B* 2003, **790**(1-2):67-78.
122. Pecher H: **Dissertation: Entwicklung von Monolithen auf basis polyfunktioneller Glycidlether für die Anwendung in der Affinitätschromatographie.** Berlin: Humboldt Universität Berlin; 2014.
123. Urh M, Simpson D, Zhao K: **Affinity chromatography: general methods.** *Methods Enzymol* 2009, **463**:417-438.
124. Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA, O'Mahony J, Whitcombe MJ: **Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003.** *Journal of Molecular Recognition* 2006, **19**(2):106-180.
125. Healthcare G: **Affinity chromatography, Principles and methods.** Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences; 2007.
126. Hjelm H, Hjelm K, Sjoquist J: **Protein A from staphylococcus-aureus - its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins.** *Febs Letters* 1972, **28**(1):73-&.
127. Josic D, Lim YP: **Analytical and preparative methods for purification of antibodies.** *Food Technology and Biotechnology* 2001, **39**(3):215-226.
128. Kronvall G: **Purification of staphylococcal protein-A using immunosorbents.** *Scandinavian Journal of Immunology* 1973, **2**(1):31-36.
129. Guss B, Eliasson M, Olsson A, Uhlen M, Frej AK, Jornvall H, Flock JI, Lindberg M: **Structure of the IgG-binding regions of streptococcal Protein-G.** *Embo Journal* 1986, **5**(7):1567-1575.

130. Mallik R, Tao J, Hage DS: **High-performance affinity monolith chromatography: Development and evaluation of human serum albumin columns.** *Analytical Chemistry* 2004, **76**(23):7013-7022.
131. Borch RF, Bernstei.Md, Durst HD: **Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent.** *Journal of the American Chemical Society* 1971, **93**(12):2897-&.
132. Hermanson GT: **Bioconjugate Techniques**; Elsevier Science; 2013.
133. Cuatrecasas P: **Protein purification by affinity chromatography - derivatizations of agarose and polyacrylamide beads.** *Journal of Biological Chemistry* 1970, **245**(12):3059-&.
134. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK: **Immobilized affinity ligand techniques.** San Diego: Academic Press; 1992.
135. Nilsson K, Mosbach K: **Para-toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins.** *European Journal of Biochemistry* 1980, **112**(2):397-402.
136. Nilsson K, Mosbach K: **Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1981, **102**(1):449-457.
137. Nilsson K, Mosbach K: **Tresyl chloride activated supports for enzyme immobilization.** *Methods in Enzymology* 1987, **135**:65-78.
138. Climent E, Martinez-Manez R, Sancenon F, Marcos MD, Soto J, Maquieira A, Amoros P: **Controlled Delivery Using Oligonucleotide-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles.** *Angewandte Chemie-International Edition* 2010, **49**(40):7281-7283.
139. Starkenstein E: **Enzyme action and its influence through neutral salts.** *Biochemische Zeitschrift* 1910, **24**:210-218.
140. Campbell DH, Luescher E, Lerman LS: **Immunologic adsorbents. 1. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1951, **37**(9):575-578.
141. Lerman LS: **A biochemically specific method for enzyme isolation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1953, **39**(4):232-236.
142. Lerman LS: **Antibody chromatography on an immunologically specific adsorbent.** *Nature* 1953, **172**(4379):635-636.
143. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB: **Selective enzyme purification by affinity chromatography.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968, **61**(2):636-&.
144. Renkin EM: **Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes.** *Journal of General Physiology* 1954, **38**(2):225-243.
145. Hage D, Bian M, Burks R, Karle E, Ohnmacht C, Wa C: **Bioaffinity chromatography.** In: *Handbook of affinity chromatography.* Edited by Hage D, 2. edn. Boca Raton: CRC press/Taylor and Francis Group; 2006: 107-135.
146. **Toyopearl** [<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-media>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
147. **Merck Millipore** [[https://www.merckmillipore.com/DE/de/products/biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/chromatography/ion-exchange-chromatography/fractogel-resin/yD2b.qB.E5MAAAFAV\\_pkiQpx,nav](https://www.merckmillipore.com/DE/de/products/biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/chromatography/ion-exchange-chromatography/fractogel-resin/yD2b.qB.E5MAAAFAV_pkiQpx,nav)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
148. **Affinity Chromatography Media Cellufine™ Amino and Formyl** [[http://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/grade/grade-1-amino\\_formyl.html](http://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/grade/grade-1-amino_formyl.html)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
149. Enke D, Janowski F, Schwieger W: **Porous glasses in the 21st century - a short review.** *Microporous and Mesoporous Materials* 2003, **60**(1-3):19-30.
150. Moltschanowa O: **Bereich der anomalen Gläser im System Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.** *Glas und Keramik* 1957, **14**:5-7.
151. **Ternäres Phasendiagramm Natriumborosilikat** [[https://de.wikipedia.org/wiki/Por%C3%B6ses\\_Glas#/media/File:Phasendiagramm\\_natriumborosilikat.jpg](https://de.wikipedia.org/wiki/Por%C3%B6ses_Glas#/media/File:Phasendiagramm_natriumborosilikat.jpg)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
152. Vogel W: **Glaschemie.** In:., 3. Ausg. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
153. Haller W: **Rearrangement kinetics of liquid-liquid immiscible microphases in alkali borosilicate melts.** *Journal of Chemical Physics* 1965, **42**(2):686-&.

154. Janowski F: **Anwendung poroeser Glaeser in der Verfahrenstechnik bietet ein sehr grosses Potential.** *Maschinenmarkt* 1993, **99**:28-33.
155. Gille W, Enke D, Janowski F: **Application of small-angle scattering for the identification of small amounts of platinum supported on porous silica.** *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2003, **64**(11):2209-2218.
156. Janowski F, Heyer W: **Poröse Gläser – Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen.** Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; 1982.
157. Schmöger C: **Dissertation: Anwendung von porösem Glas als Trägermaterial in der Übergangsmetallkatalyse.** Universität Jena; 2009.
158. Gille W, Enke D, Janowski F, Hahn T: **About the realistic porosity of porous glasses.** *Journal of Porous Materials* 2003, **10**(3):179-187.
159. DIN: **Bestimmung der Porenvolumenverteilung und der spezifischen Oberfläche von Feststoffen durch Quecksilberintrusion.** Berlin: Beuth Verlag; 1993.
160. Klobes P, Meyer K, Munro R: **Porosity and specific surface area measurements for solid materials.** Washington: National Institute of Standards and Technology; 2006.
161. Mortimer RG: **Physical Chemistry:** Elsevier inc.; 2008.
162. McClella, Al, Harnsber, Hf: **Cross-sectional areas of molecules adsorbed on solid surfaces.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1967, **23**(4):577-&.
163. Gregg S, Sing K: **Physical adsorption of gases by non-porous solids.** In: *Adsorption, surface area and porosity.* London: Academic Press; 1967: 35-120.
164. Baiker A, Richarz W: **Comparison of methods for determination of pore-radii distribution and specific surface-area of porous catalysts.** *Chemie Ingenieur Technik* 1977, **49**(5):399-403.
165. Linsen B, van den Heuvel A: **Pore structures.** In: *The solid-gas interface.* Edited by Flood E. New York: Dekker; 1967: 1025-1053.
166. Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP: **The determination of pore volume and area distributions in porous substances. 1. Computations from nitrogen isotherms.** *Journal of the American Chemical Society* 1951, **73**(1):373-380.
167. Deboer JH, Linsen BG, Osinga TJ: **Studies on pore systems in catalysts. 6. Universal T curve.** *Journal of Catalysis* 1965, **4**(6):643-&.
168. Drake LC, Ritter HL: **Pore-size distribution in porous materials.** *Industrial and Engineering Chemistry-Analytical Edition* 1945, **17**(12):787-791.
169. Meyer K, Lorenz P, Bohlkuhn B, Klobes P: **Porous solids and their characterization - Methods of investigation and application.** *Crystal Research and Technology* 1994, **29**(7):903-930.
170. Washburn EW: **Note on a method of determining the distribution of pore sizes in a porous material.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1921, **7**:115-116.
171. Washburn EW: **The dynamics of capillary flow.** *Physical Review* 1921, **17**(3):273-283.
172. Klobes P, Meyer K, Munro R: **Pore analysis by mercury intrusion techniques (mercury porosimetry).** In: *Porosity and specific surface area measurements for solid materials.* Washington: National Institute of Standards and Technology; 2006: 40-47.
173. Rouquerol J, Baron G, Denoyel R, Giesche H, Groen J, Klobes P, Levitz P, Neimark AV, Rigby S, Skudas R *et al*: **Liquid intrusion and alternative methods for the characterization of macroporous materials (IUPAC Technical Report).** *Pure and Applied Chemistry* 2012, **84**(1):107-136.
174. Leon C: **New perspectives in mercury porosimetry.** *Advances in Colloid and Interface Science* 1998, **76**:341-372.
175. Felipe C, Cordero S, Kornhauser I, Zgrablich G, Lopez R, Rojas F: **Domain complexation diagrams related to mercury intrusion-extrusion in Monte Carlo-simulated porous networks.** *Particle & Particle Systems Characterization* 2006, **23**(1):48-60.
176. Rootare HM, Prenzlöw CF: **Surface areas from mercury porosimeter measurements.** *Journal of Physical Chemistry* 1967, **71**(8):2733-&.
177. Kjeldahl J: **Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.** *Zeitschrift für Analytische Chemie* 1883, **22**(1):366-382.



178. Soret J: **Recherches sur l'absorption des rayons ultra-violetes par diverses substances.** *Arch Sci Phys Nat* 1883, **10**:429-494.
179. Holiday ER: **Spectrophotometry of proteins. I. Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. II. Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins.** *Biochemical Journal* 1936, **30**:1795-1803.
180. Beaven GH, Holiday ER: **Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids.** *Advances in Protein Chemistry* 1952, **7**:319-386.
181. Warburg O, Christian W: **Insulation and crystallisation of the fermenting process of Enolase.** *Biochemische Zeitschrift* 1942, **310**(6):384-421.
182. Kalb VF, Bernlohr RW: **New spectrophotometric assay for protein in cell-extracts.** *Analytical Biochemistry* 1977, **82**(2):362-371.
183. Scopes RK: **Measurement of protein by spectrophotometry at 205-nm.** *Analytical Biochemistry* 1974, **59**(1):277-282.
184. Scientific T: **Evolution 200 Series User Guide 2010, 162**: Thermo Scientific; 2010.
185. Riegler E: **A colorimetric method for determination of albumin.** *Z Anal Chem* 1914, **53**:242-245.
186. Kingsley GR: **The determination of serum total protein, albumin, and globulin by the biuret reaction.** *Journal of Biological Chemistry* 1939, **131**(1):197-200.
187. Kingsley GR: **The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry.** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1942, **27**:840-845.
188. Weichselbaum TE: **An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.** *American journal of clinical pathology* 1946, **10**:40-49.
189. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: **Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.** *Journal of Biological Chemistry* 1949, **177**(2):751-766.
190. Scientific T: **Total Protein (Biuret).** In.; 2015.
191. Okutucu B, Dincer A, Habib O, Zihnioglu F: **Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007, **70**(5):709-711.
192. Ellman GL: **Biuret reaction - Changes in ultraviolet absorption spectra and its application to determination of peptide bonds.** *Analytical Biochemistry* 1962, **3**(1):40-&.
193. Scientific T: **Pierce Protein Pierce Protein Assay technical Handbook**, Version 2 edn: Thermo Fisher Scientific Inc.; 2010.
194. Hartree EF: **Determination of protein - Modification of Lowry method that gives a linear photometric response.** *Analytical Biochemistry* 1972, **48**(2):422-&.
195. Pomory CM: **Color development time of the Lowry protein assay.** *Analytical Biochemistry* 2008, **378**(2):216-217.
196. Compton SJ, Jones CG: **Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay.** *Analytical Biochemistry* 1985, **151**(2):369-374.
197. Bradford MM: **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 1976, **72**(1-2):248-254.
198. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry* 1951, **193**(1):265-275.
199. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Analytical Biochemistry* 1985, **150**(1):76-85.
200. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD: **Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.** *Anal Biochem* 1988, **175**(1):231-237.
201. Jones LJ, Haugland RP, Singer VL: **Development and characterization of the NanoOrange (R) protein quantitation assay: A fluorescence-based assay of proteins in solution.** *Biotechniques* 2003, **34**(4):850-+.

202. Gehrke CW, Wall LL, Absheer JS, Kaiser FE, Zumwalt RW: **Sample preparation for chromatography of amino-acids - acid-hydrolysis of proteins.** *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1985, **68**(5):811-821.
203. Fehrenbach T: **Dissertation: Analyse von Aminosäuren, Proteinen und Nitroderivaten in atmosphärischen Aerosolen und in Straßenstaub.** München: Technische universität München; 2007.
204. Fountoulakis M, Lahm HW: **Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins.** *Journal of Chromatography A* 1998, **826**(2):109-134.
205. Kroll J, Rawel H, Krock R: **Microwave digestion of proteins.** *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 1998, **207**(3):202-206.
206. Joergensen L, Thestrup HN: **Determination of amino-acids in biomass and protein samples by microwave hydrolysis and ion-exchange chromatography.** *Journal of Chromatography A* 1995, **706**(1-2):421-428.
207. Weiss M, Manneberg M, Juranville JF, Lahm HW, Fountoulakis M: **Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins.** *Journal of Chromatography A* 1998, **795**(2):263-275.
208. Tatar E, Khalifa M, Zaray G, Molnarperl I: **Comparison of the recovery of amino-acids in vapor-phase hydrolysates of proteins performed in a pico-tag work station and in a microwave hydrolysis system.** *Journal of Chromatography A* 1994, **672**(1-2):109-115.
209. Walsh KA, Brown JR: **Internal standards for amino acids analyses.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1962, **58**(3):596-&.
210. Gardner MLG: **A comparison of internal and external standardization in amino-acid analysis.** *Analytical Biochemistry* 1985, **150**(1):174-177.
211. Meade SJ, Reid EA, Gerrard JA: **The impact of processing on the nutritional quality of food proteins.** *Journal of AOAC International* 2005, **88**(3):904-922.
212. Koshy KM, Boggs JM: **Interference of carbohydrates in the quantitation of protein-bound citrulline by amino-acid-analysis.** *Analytical Biochemistry* 1993, **208**(2):375-381.
213. Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn PY: **Nature of polyphenol-protein interactions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, **44**(1):80-85.
214. Rawel HA, Meidtnr K, Kroll J: **Binding of selected phenolic compounds to proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, **53**(10):4228-4235.
215. Feldmann I: **Grundlagen der Proteinbestimmung.** In. 22. Arbeitstagung "Mikromethoden in der Proteinchemie"; 2015.
216. Adebisi AP, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K: **Acid hydrolysis of protein in a microcapillary tube for the recovery of tryptophan.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2005, **69**(1):255-257.
217. Ng LT, Pascaud A, Pascaud M: **Hydrochloric-acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid-chromatography.** *Analytical Biochemistry* 1987, **167**(1):47-52.
218. Hirs CHW, Stein WH, Moore S: **The amino acid composition of ribonuclease.** *Journal of Biological Chemistry* 1954, **211**(2):941-950.
219. Ozols J: **Amino-acid-analysis.** *Methods in Enzymology* 1990, **182**:587-601.
220. Muramoto K, Kamiya H: **Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid-hydrolysis in the presence of phenol.** *Analytical Biochemistry* 1990, **189**(2):223-230.
221. Yano H, Aso K, Tsugita A: **Further study on gas-phase acid hydrolysis of protein - Improvement of recoveries for tryptophan, tyrosine and methionine.** *Journal of Biochemistry* 1990, **108**(4):579-582.
222. Yokote Y, Arai KM, Akahane K: **Recovery of tryptophan from 25-minute acid hydrolysates of protein.** *Analytical Biochemistry* 1986, **152**(2):245-249.
223. Liu TY, Boykins RA: **Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube - high recovery of labile amino-acids.** *Analytical Biochemistry* 1989, **182**(2):383-387.
224. Macdonald JL, Krueger MW, Keller JH: **Oxidation and hydrolysis determination of sulfur amino-acids in food and feed ingredients - Collaborative study.** *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1985, **68**(5):826-829.

225. Gehrke CW, Rexroad PR, Schisla RM, Absheer JS, Zumwalt RW: **Quantitative-analysis of cystine, methionine, lysine and 9 other amino-acids by a single oxidation-4 hour hydrolysis method.** *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1987, **70**(1):171-174.
226. Inglis AS: **Single hydrolysis method for all amino-acids, including cysteine and tryptophan.** *Methods in Enzymology* 1983, **91**:26-36.
227. Moore S, Stein WH: **Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids.** *Journal of Biological Chemistry* 1948, **176**(1):367-388.
228. Roth M: **Fluorescence reaction for amino acids.** *Analytical Chemistry* 1971, **43**(7):880-&.
229. Roth M, Hampai A: **Column chromatography of amino-acids with fluorescence detection.** *Journal of Chromatography* 1973, **83**(AUG29):353-356.
230. Bayer E, Grom E, Kaltenegger B, Uhmman R: **Separation of amino-acids by high-performance liquid-chromatography** *Analytical Chemistry* 1976, **48**(8):1106-1109.
231. Engelhar.H, Asshauer J, Neue U, Weigand N: **Separation on heavily loaded small particle columns in high-speed liquid-chromatography.** *Analytical Chemistry* 1974, **46**(3):336-340.
232. Lin JK, Lai CC: **High-performance liquid-chromatographic determination of naturally-occurring primary and secondary-amines with dabsyl chloride.** *Analytical Chemistry* 1980, **52**(4):630-635.
233. Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL: **Rapid analysis of amino-acids using pre-column derivatization.** *Journal of Chromatography* 1984, **336**(1):93-104.
234. Cohen SA, Michaud DP: **Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography.** *Analytical Biochemistry* 1993, **211**(2):279-287.
235. Anzini M, Di Capua A, Valenti S, Brogi S, Rovini M, Giuliani G, Cappelli A, Vomero S, Chiasserini L, Segà A *et al*: **Novel Analgesic/Anti-Inflammatory Agents: 1,5-Diarylpyrrole Nitrooxyalkyl Ethers and Related Compounds as Cyclooxygenase-2 Inhibiting Nitric Oxide Donors.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, **56**(8):3191-3206.
236. Rannard SP, Davis NJ: **Controlled synthesis of asymmetric dialkyl and cyclic carbonates using the highly selective reactions of imidazole carboxylic esters.** *Organic Letters* 1999, **1**(6):933-936.
237. Corey EJ, Schmidt G: **Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media.** *Tetrahedron Letters* 1979(5):399-402.
238. Bahlmann A, Weller MG, Panne U, Schneider RJ: **Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, **395**(6):1809-1820.
239. Rodbard D, Munson PJ, Thakur AK: **Quantitative characterization of hormone receptors.** *Cancer* 1980, **46**(12):2907-2918.
240. Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA: **A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays.** *Journal of Immunological Methods* 2000, **233**(1-2):47-56.
241. **Pierce BCA Protein Assay Kit**  
[[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
242. **Instruction Manual Toyopearl AF-Formyl-650M**  
[<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/ADC3F6A3-70B4-4081-842A-6EC494161613/0/IM10.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
243. **Instruction Manual Toyopearl® AF-Tresyl-650M**  
[<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/AA1F015C-E7A6-490E-9E8F-E99CE46A3538/0/IM13.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
244. **Instruction Manual for TOYOPEARL and TSKgel® PW-type Resins**[<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/IM021ec9rgrizxsvcpqapvjuootoovjjvdlaxqun.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
245. **Cellufine Formyl**  
[[http://www.jnc-corp.co.jp/fine/pdf/en/instructions/inst\\_Formyl\\_IN011\\_Ver3\\_3\\_EN\\_20110322.pdf](http://www.jnc-corp.co.jp/fine/pdf/en/instructions/inst_Formyl_IN011_Ver3_3_EN_20110322.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.

246. **NHS-activated Sepharose**  
[[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314823637792/litdoc71500014AD\\_20110831230521.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314823637792/litdoc71500014AD_20110831230521.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
247. **Pierce NHS-activated Agarose Dry Resin**  
[[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011707\\_Pierce\\_NHSActiv\\_Agarose\\_Dry\\_Resin\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011707_Pierce_NHSActiv_Agarose_Dry_Resin_UG.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
248. **NAb Spin Kit 0.2mL for Purification**  
[<https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/89949.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
249. Regenmortel vMHV, Briand JP, Muller S, Plaué S: **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**: ELSEVIER; 1988.
250. Paek SH, Bachas LG, Schramm W: **Defined analyte enzyme conjugates as signal generators in immunoassays**. *Analytical Biochemistry* 1993, **210**(1):145-154.
251. Nakane PK, Kawaoi A: **Peroxidase-labeled antibody - New method of conjugation**. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1974, **22**(12):1084-1091.
252. Miron T, Wilchek M: **A spectrophotometric assay for soluble and immobilized N-hydroxy-succinimide esters**. *Analytical Biochemistry* 1982, **126**(2):433-435.
253. Reth M: **Matching cellular dimensions with molecular sizes**. *Nature Immunology* 2013, **14**(8):765-767.
254. Werner TC, Cathou RE, Bunting JR: **Shape of immunoglobulin G molecules in solution**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1972, **69**(4):795-799.
255. Cuatrecasas P, Parikh I: **Adsorbents for affinity chromatography - Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose**. *Biochemistry* 1972, **11**(12):2291-&.
256. Molnár-Perl I: **Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography: Methods and Protocol**. *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography: Methods and Protocol* 2005, **70**.
257. Flecha FLG, Levi V: **Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy**. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2003, **31**(5):319-322.
258. **Affinity Chapter** [[www.separations.eu.tosohbioscience.com/.../c15p29a\\_afc.pdf](http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/.../c15p29a_afc.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
259. **Affinity Chromatography**  
[[separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit\\_EN/Catalog/Medias/Cat5\\_AFC.pdf](http://separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_EN/Catalog/Medias/Cat5_AFC.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
260. Winkler G, Wolschann P, Briza P, Heinz FX, Kunz C: **Spectral properties of trifluoroacetic-acid acetonitrile gradient systems for separation of picomole quantities of peptides by reversed-phase high-performance liquid-chromatography**. *Journal of Chromatography* 1985, **347**(1):83-88.
261. Griffith HAT, Abuknesha RA: **A highly efficient preparative-scale generic immunoaffinity chromatography method for the purification of antibodies to hydrophobic haptens: Purification procedure and monitoring tests**. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005, **827**(2):182-192.
262. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R: **Affinity chromatography as a tool for antibody purification**. *Methods* 2012, **56**(2):116-129.
263. Kovar KA: **The Meisenheimer complex--the basis of pharmaceutical color reactions**. *Pharmazie in unserer Zeit* 1972, **1**(1):16-20.
264. **Detergens** [<https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/Detergenzien.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
265. **Sodium Deoxycholate** [<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/89904.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
266. **HiTrap NHS-activated Data File 18-1134-80 AC**  
[[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1335359522418/litdoc18113480\\_20120425152132.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1335359522418/litdoc18113480_20120425152132.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
267. Mizuta Y, Onodera T, Singh P, Matsumoto K, Miura N, Toko K: **Development of an oligo(ethylene glycol)-based SPR immunosensor for TNT detection**. *Biosensors & Bioelectronics* 2008, **24**(2):191-197.

268. Nagatomo K, Kawaguchi T, Miura N, Toko K, Matsumoto K: **Development of a sensitive surface plasmon resonance immunosensor for detection of 2,4-dinitrotoluene with a novel oligo (ethylene glycol)-based sensor surface.** *Talanta* 2009, **79**(4):1142-1148.
269. Wolter A, Niessner R, Seidel M: **Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays.** *Analytical Chemistry* 2007, **79**(12):4529-4537.
270. Firer MA: **Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2001, **49**(1-3):433-442.
271. BioCat: **Trisopor-Protein A.** In. Heidelberg.
272. Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ: **A view of the hydrophobic effect.** *Journal of Physical Chemistry B* 2002, **106**(3):521-533.
273. **Venture Immunoaffinity Columns & Cartridges** [[www.ingenieria-analitica.com/downloads/dl/file/id/430/product/7/columnas\\_venture\\_de\\_inmunoafinidad.pdf](http://www.ingenieria-analitica.com/downloads/dl/file/id/430/product/7/columnas_venture_de_inmunoafinidad.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
274. **Immuno Affinity Column for the Aflatoxins B1, B2, G1 and G2** [<http://www.stablearm.com/immuno-affinity-column-aflatoxins-b1-b2-g1-and-g2>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
275. **OtaClean Immuno Affinity Column for Ochratoxin A** [<http://www.stablearm.com/otaclean-immuno-affinity-column-ochratoxin>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
276. **Easy-Extract Vitamin B12** [[www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4087/EASI-EXTRACT-VITAMIN-B12-IFU-P80V20.pdf](http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4087/EASI-EXTRACT-VITAMIN-B12-IFU-P80V20.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
277. **RIDA Aflatoxin** [[www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4167/R5001-Afla-column-14-07-03.pdf](http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4167/R5001-Afla-column-14-07-03.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
278. **RIDA Ochratoxin** [[www.xygen.com/pdfs/extraction/Ochratoxin%20A%20Column.pdf](http://www.xygen.com/pdfs/extraction/Ochratoxin%20A%20Column.pdf)], letzter Zugriff: 29.11.2016.
279. **Ochraprep P14** [<http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4207/OCHRAPREP-IFU-P14V16.pdf>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
280. **ProSep® Ultra Plus Chromatography Resin** [<http://www.merckmillipore.com/DE/de/products/biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/chromatography/affinity-chromatography/prosep-ultra-plus-resin/2vKb.qB.O9cAAAF5O5kiQpx,nav>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
281. **Toyopearl AF-rProtein A HC-650F** [<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/ProteinA/ToyopearlAF-rProteinAHC-650.htm>], letzter Zugriff: 29.11.2016.
282. **Protein A Sepharose CL-4B** [<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?categoryId=11498&catalogId=10101&productId=22951&storeId=11762&langId=-1>], letzter Zugriff: 29.11.2016.